UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 2017 THESE 2017/TOU3/2068

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

par

Marine LE BOUAR

INTERET DU DOSAGE DES CHAINES LEGERES LIBRES SERIQUES DANS LA LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE

le 3 Octobre 2017

Directeur de thèse : Madame le Docteur Françoise DURRIEU

JURY

Monsieur le Professeur Nicolas SEVENET	Président
Monsieur le Professeur Arnaud PIGNEUX	Assesseur
Madame le Docteur Françoise DURRIEU	Assesseur
Monsieur le Docteur Fontanet BIJOU	Assesseur

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 17 février 2017

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
Mme FOURASTÉ I.	Pharmacognosie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIÉ P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
M. HOUIN G.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SÉGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie
Mme GANDIA-MAILLY P. (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S.	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAEVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. OLICHON A.	Biochimie
PEM. PERE D.	Pharmacognosie
Mme PORTHE G.	Immunologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE A.	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C.	Physiologie
Mme FONTAN C.	Biophysique
Mme KELLER L.	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique

Au Professeur Nicolas SEVENET,

Professeur des universités - Praticien Spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer,
Service d'oncogénétique de l'Institut Bergonié.

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous adresse mes remerciements respectueux et ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Françoise DURRIEU,

Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer,
Laboratoire de biologie médicale de l'Institut Bergonié.

Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail. Je te remercie également pour ta disponibilité, tes encouragements et le partage de tes connaissances tout au long de ce travail mais aussi durant ce semestre d'internat passé à tes côtés. Sois assurée de mon profond respect et de ma plus grande reconnaissance.

Au Professeur Arnaud PIGNEUX,

Professeur des universités - Praticien hospitalier,
Service d'hématologie clinique et thérapie cellulaire du CHU de Bordeaux.

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de ma grande considération.

Au Docteur Fontanet BIJOU,

Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer,
Service d'hématologie clinique de l'Institut Bergonié.

Je vous remercie d'avoir aimablement accepté de prendre part à ce jury et de toute l'attention que vous voudrez porter à ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma très profonde gratitude.

Table des matières

Table des matières **5**

Liste des abréviations **8**

Liste des figures **10**

Liste des tableaux **12**

Introduction **13**

I. Revue de la littérature **14**

1. La leucémie lymphoïde chronique **14**

1.1. Généralités 14

1.1.1. Définition 14

1.1.2. Epidémiologie 15

1.1.3. Physiopathologie 15

1.1.4. Diagnostic 16

1.1.5. Traitement 19

1.1.5.1. Indications de traitement 19

1.1.5.2. Molécules utilisées et recommandations 20

1.2. Facteurs pronostiques 22

1.2.1. Classification clinique 22

1.2.2. Cytogénétique 25

1.2.2.1. Délétion 13q14 26

1.2.2.2. Trisomie 12 26

1.2.2.3. Délétion 11q 26

1.2.2.4. Délétion 17p 27

1.2.2.5. Autres anomalies génétiques 27

1.2.3. Biologie moléculaire 28

1.2.4. Facteurs pronostiques immunophénotypiques 29

1.2.4.1. CD38 29

1.2.4.2. ZAP-70 30

1.2.5. Marqueurs sériques 31

1.2.5.1. β2-microglobuline 31

1.2.5.2. Thymidine kinase sérique 31

1.2.5.3. CD23 soluble 32

1.2.6. Données cinétiques des cellules leucémiques 32

1.2.7. Place de l'étude des marqueurs pronostiques dans la prise en charge des patients 33

1.3. Intérêt de l'évaluation de la maladie résiduelle dans la LLC 34
1.3.1. Définition de la MRD 34
1.3.2. Méthodes de détection de la MRD dans la leucémie lymphoïde chronique 34
1.3.3. Impact de la présence de cellules leucémiques résiduelles sur l'évolution des patients 36
1.3.4. Impact de l'évaluation de la MRD sur les pratiques cliniques 37
1.3.5. Place de la MRD dans la prise en charge des patients 38
2. Les chaines légères libres sériques 39
2.1. Définition 39
2.2. Technique de détection/quantification 40
2.3. Utilisation en pratique clinique 42
3. Problématique et objectifs 45
II. Matériels et méthodes 46
1. Patients 46
2. Recueil de données 46
3. Marqueurs biologiques 47
3.1. Dosage de chaines légères libres sériques 47
3.2. Cytométrie en flux : diagnostic, évaluation de la maladie résiduelle, expression de CD38 et ZAP-70 47
3.3. FISH 48
3.4. Autres dosages 49
4. Données statistiques 50
III. Résultats 51
1. Etude de l'impact pronostique du dosage de chaines légères libres sériques au diagnostic 51
1.1. Caractéristiques cliniques et biologiques des patients analysés 51
1.2. Répartition des anomalies de dosage de chaines légères libres sériques au diagnostic de la maladie 53
1.3. Analyse de la valeur pronostique du ratio κ/λ et de la somme κ + λ 56
1.3.1. Survie sans traitement des patients selon la présence d'une anomalie du ratio κ/λ 56
1.3.2. Recherche d'une valeur seuil de κ+λ permettant de discriminer les patients traités des patients non traités 58
1.3.3. Analyse des temps de survie sans traitement des patients présentant un taux de κ+λ augmenté 59
1.3.4. Etude de la relation entre le ratio κ/λ et la somme κ+λ 60
1.4. Analyse des relations entre les anomalies de dosage des chaines légères libres sériques et les autres facteurs pronostiques 62

1.4.1. Etude de l'impact des facteurs pronostiques déjà décrits sur la survie sans traitement 62
1.4.2. Corrélation entre la présence d'anomalies de dosage des chaines légères libres sériques et la présence d'autres facteurs pronostiques péjoratifs 64
1.4.3. Comparaison des facteurs pronostiques 66
1.5. Etablissement d'un score prédictif de la survie sans traitement 67
1.6. Impact de la lymphocytose et de l'hypogammaglobulinémie sur les résultats 68
2. Etude de l'intérêt du dosage des chaines légères libres sériques dans le suivi de la LLC 70
2.1. Données concernant les patients analysés 70
2.2. Relation entre MRD et anomalies du dosage des chaines légères libres sériques 71
2.3. Etude des variations de la maladie résiduelle et des dosages de chaines légères libres sériques 73
IV. Discussion 75
Conclusion.....83
Bibliographie.....84
Abstract 95
Résumé 96

Liste des abréviations

AA700	Allophycocyanin Alexafluor 700
AA750	Allophycocyanin Alexafluor 750
ADN	Acide Desoxyribonucléique
APC	Allophycocyanin
ARN	Acide ribonucléique
ASO	Oligonucléotides Spécifiques d'Allèle
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BCL2	B-cell Lymphoma 2
BCR	B-cell Receptor
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing protein3
BTK	Bruton Tyrosine Kinase
CD23s	CD23 soluble
CDK2	Cyclin Dependant Kinase 2
CDK4	Cyclin Dependant Kinase 4
CDR3	Complementary Determining Region 3
CLL	Chaine légère libre
CLL-IPI	Indice pronostique international de la LLC
CMF	Cytométrie en Flux
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CR	Complete Response
CRi	CR with incomplete marrow recovery
ECD	Phycoerythrin Texas Red
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EMA	European Medicine Agency
ESMO	European Society for Medical Oncology
FISH	Hybridation In Situ par Fluorescence
FITC	Fluoresceine Isothiocyanate
HR	Hazard Ratio
IC	Intervalle de confiance
IF	Immunofixation
IGH	Immunoglobin Heavy
IGVH	Immunoglobulin Variable region Heavy chain
IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia

KO	Krome Orange
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
MBL	Lymphocytose B monoclonale
MDM2	Murine Double Minute 2
MDRD	Modification of the Diet in Renal Disease
MGUS	Gammapathie monoclonale de signification indéterminée
miRNA	micro-RNA
MRD	Minimal Residual Disease
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
NGS	Next Generation Sequencing
PB	Pacific Blue
PC5.5	Phycoerythrin Cyanin 5.5
PC7	Phycoerythrin Cyanin 7
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaine
PD	Progressive Disease
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PM	Poids moléculaire
PR	Partial Response
RB	Retinoblastoma
RFC	Rituximab Fludarabine Cyclophosphamide
RIHN	Référentiel des actes innovants hors nomenclature
ROC	Receiver Operating Characteristic
SD	Stable Disease
SF3B1	Splicing Factor 3B subunit 1
sFLC	serum Free Light Chain
sTK	Thymidine Kinase sérique
TCR	T-cell Receptor
TDL	Temps de doublement lymphocytaire
TP53	Tumor Protein 53
VPP	Valeur prédictive positive
VPN	Valeur prédictive négative
ZAP-70	Zêta Associated Protein-70

Liste des figures

Figure 1 - Frottis sanguin d'un patient atteint de LLC. Présence de lymphocytes matures et d'ombres de Gumprecht....17

Figure 2 - Stratégie de traitement de 1ère ligne des patients atteints de LLC ou de lymphome lymphocytique....20

Figure 3 - Aires ganglionnaires définies dans la classification de Binet....23

Figure 4 - Survie globale des patients présentant une LLC selon les classifications de Binet (a) et Rai (b)....24

Figure 5 - Impact pronostique des anomalies génétiques les plus fréquemment décrites dans la LLC25

Figure 6 - Sites de reconnaissance d'une chaine légère libre lors de la technique turbidimétrique ou néphélémétrique....41

Figure 7 - Survie sans traitement et survie globale selon la présence d'anomalies du dosage des chaines légères libres sériques. Maurer *et al*. 44

Figure 8 - Temps de survie sans traitement selon la présence d'anomalies de dosage des chaines légères libres sériques....55

Figure 9 - Survie sans traitement des patients présentant ou non une anomalie du ratio chez tous les patients au diagnostic....57

Figure 10 - Survie sans traitement des patients présentant ou non une anomalie du ratio, chez les patients en stade A....57

Figure 11 - Survie sans traitement selon la présence d'une anomalie en faveur d'une surproduction de kappa ou lambda....58

Figure 12 - Temps de survie sans traitement des patients présentant ou non une anomalie de $\kappa+\lambda$ chez tous les patients au diagnostic....59

Figure 13 - Temps de survie sans traitement des patients présentant ou non une anomalie de $\kappa+\lambda$, chez les patients en stade A....60

Figure 14 – Nombre de patients présentant des anomalies de la somme $\kappa+\lambda$ selon le résultat du ratio κ/λ....60

Figure 15 - Survie sans traitement selon la présence d'anomalies de κ/λ et $\kappa+\lambda$....61

Figure 16 - Survie sans traitement selon les résultats du score établi....67

Figure 17 - Impact de la lymphocytose B sur la valeur pronostique des anomalies des chaines légères libres sériques....68

Figure 18 - Impact de l'hypogammaglobulinémie sur la valeur pronostique des anomalies de dosage des chaines légères libres sériques....69

Figure 19 - Relation entre les anomalies de dosage des chaines légères libres et la positivité de la MRD 71
Figure 20 - Temps de survie avant initiation d'une nouvelle ligne de traitement selon la présence d'anomalies du ratio κ/λ ou de la somme κ+λ 72
Figure 21 - Evolution de la MRD et du ratio κ/λ au cours du temps, exemple d'un patient 73
Figure 22 - Evolution de la MRD et de la somme κ+λ au cours du temps, exemple d'un patient 73
Figure 23 - Concordance entre les variations de la MRD et celles de la somme κ+λ 74
Figure 24 - Variation de la somme κ+λ en fonction de la variation de la maladie résiduelle 74

Liste des tableaux

Tableau 1 - Score de Matutes ou du Royal Marsden Hospital 18
Tableau 2 - Critères de réponse au traitement (Hallek et al., Blood. 2008).....21
Tableau 3 - Classification de RAI 22
Tableau 4 - Classification de Binet 23
Tableau 5 - Caractéristiques des différentes méthodes d'évaluation de la MRD 35
Tableau 6 - Sensibilité des techniques pour la détection des chaines légères libres sériques 41
Tableau 7 - Principales caractéristiques cliniques et biologiques de patients étudiés au diagnostic ...52
Tableau 8 - Anomalies de dosage des chaines légères libres sériques selon l'instauration ultérieure ou non d'un traitement 53
Tableau 9 - Pourcentage de patients traités à la fin de l'étude selon les résultats des différents facteurs pronostiques.....63
Tableau 10 - Impact des différents facteurs pronostiques sur la survie sans traitement.....64
Tableau 11 - Relation entre les anomalies du ratio κ/λ et de la somme $\kappa+\lambda$ avec différents marqueurs pronostiques de la LLC.....65
Tableau 12 – Résultats de l'analyse univariée selon le modèle de régression de Cox pour l'ensemble des facteurs pronostiques étudiés 66
Tableau 13 - Caractéristiques cliniques et biologiques des patients ayant eu une évaluation de la MRD simultanément à un dosage de CLL 70
Tableau 14 - Evaluation de la concordance entre la présence ou non de cellules leucémiques résiduelles et d'anomalies de dosage des chaines légères libres sériques selon deux seuils de MRD 72

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte en France. Malgré un pronostic globalement bon, l'évolution de cette pathologie est très hétérogène. En particulier, parmi les patients diagnostiqués à un stade précoce, certains restent de nombreuses années sans évolution notable alors que d'autres nécessitent une mise sous traitement rapide. De nombreux facteurs pronostiques ont été proposés pour évaluer l'agressivité de la maladie. Aucune étude à ce jour n'a cependant trouvé de marqueur idéal, alliant simplicité technique, faible coût, sensibilité et spécificité.

Les chaines légères libres sériques sont des fractions d'anticorps présentes en excès dans le sérum et sécrétées par les cellules de la lignée lymphoïde B. Utilisées comme outil diagnostique et pronostique dans le myélome, plusieurs études ont montré qu'un pourcentage important de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique présentaient également des perturbations de leur taux. Nous nous proposons d'étudier dans ce travail l'intérêt du dosage des chaines légères libres sériques au moment du diagnostic en tant que marqueur pronostique ainsi qu'au cours du suivi de patients atteints de LLC.

Nous décrirons dans une première partie de ce mémoire les connaissances actuelles disponibles sur la leucémie lymphoïde chronique d'une part et sur les chaines légères libres sériques d'autre part.

La seconde partie aura pour objet un travail réalisé au sein du laboratoire de biologie médicale de l'Institut Bergonié, visant à évaluer l'intérêt du dosage des chaines légères libres sériques au diagnostic, en tant que marqueur pronostique, ainsi qu'au cours du suivi, comme marqueur de la maladie résiduelle.

I. Revue de la littérature

1. La leucémie lymphoïde chronique

1.1. Généralités

1.1.1. Définition

La leucémie lymphoïde chronique est définie par la prolifération et l'accumulation de lymphocytes B matures monoclonaux, d'immunophénotype caractéristique, dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires.

Deux entités sont définies :

- La « véritable » LLC est définie par un taux sanguin de lymphocytes B supérieur à 5 x 10^9 par litre (5 G/L)
- Le lymphome lymphocytique correspond à la version « tumorale » de la maladie. Il est défini par la présence d'adénopathie(s) et/ou d'une splénomégalie dont l'évaluation histopathologique révèle un clone de lymphocytes B matures, exprimant les marqueurs typiques de la LLC. La lymphocytose B sanguine est cependant inférieure à 5 G/L dans ce cas-là.

La lymphocytose B monoclonale (MBL), correspond à une phase « pré-leucémique » : présence d'un clone de lymphocytes B dont le taux est inférieur à 5 G/L chez des patients asymptomatiques. L'évolution de cette entité en LLC est estimée à 1 à 2% par an. Plusieurs études ont montré que 5 à 12% des adultes sains de plus de 40 ans ayant un taux de lymphocytes normal avaient un clone circulant de LLC et pouvaient donc être classés dans cette catégorie (1–3).

1.1.2. Epidémiologie

La leucémie lymphoïde chronique fait partie des hémopathies malignes les plus fréquentes. Elle représente environ 30% des leucémies de l'adulte. Son incidence était estimée à 4500 nouveaux cas en 2012 en France. A l'échelle internationale, l'incidence standardisée estimée est de 4,4 pour 100 000 personnes-année chez l'homme et de 2,2 pour 100 000 personnes-année chez la femme (4). Son incidence varie selon les régions du globe, la LLC étant fréquente en Europe et en Amérique du Nord et beaucoup plus rare en Asie et en Afrique.
Cette hémopathie touche l'homme dans 56,5% des cas. L'âge médian au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et 74 ans chez la femme. Elle est exceptionnelle avant 35 ans.

Sur la période de 2005 à 2010 en France, la survie nette de la LLC à 5 ans (c'est-à-dire la survie qui serait observée si la seule cause de décès était cette maladie) était de 83%. Cette survie est plus importante chez la femme que chez l'homme (88% contre 84%) et diminue avec l'âge, puisqu'elle est estimée à 93% pour les patients âgés de 15 à 55 ans et à 76% chez les patients âgés de plus de 75 ans (4).
Récemment, une amélioration de la survie des patients atteints de LLC a été observée, probablement liée à une meilleure compréhension de la maladie et à une meilleure adaptation de la prise en charge selon les comorbidités et l'âge des patients. De plus, l'apparition de nouvelles molécules comme les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de la signalisation du BCR (B-cell Receptor) ont très probablement également un effet sur la diminution de la mortalité.

A ce jour, il n'a pas été déterminé de facteurs favorisants l'apparition d'une LLC. Cependant, une susceptibilité génétique semble probable. En effet, la multiplication du risque de développer une LLC ou un lymphome varie de 3 à 7,5 chez les apparentés de premier degré de patients atteints de LLC (5,6).

1.1.3. Physiopathologie

Les mécanismes physiopathologiques de la maladie sont nombreux, complexes et certains domaines restent encore mal connus.
L'origine des cellules leucémiques reste notamment incertaine. L'analyse des profils d'expression génique est en faveur d'un progéniteur cellulaire commun qui serait proche de cellules B ayant

expérimenté l'antigène (7,8). L'origine exacte de ce progéniteur reste cependant encore à ce jour indéterminée.

Plusieurs mécanismes physiopathologiques jouent par la suite un rôle dans la maladie.
La stimulation antigénique du BCR serait primordiale dans le développement de la pathologie, comme le prouve l'efficacité des inhibiteurs de kinase, qui bloquent la cascade de signalisation du BCR. L'interaction entre l'immunoglobuline de surface et un antigène qui semble avoir lieu au cours de la maladie entraine une activation constitutive du BCR *in vivo* (9–11), dont les effets vont de l'anergie de la cellule à la prolifération cellulaire (12–14).

L'accumulation de cellules clonales B dans la LLC peut être expliquée principalement par une résistance accrue à l'apoptose. Un certain nombre d'acteurs et d'évènements concourent à ce phénomène, notamment des altérations génétiques touchant des protéines impliquées dans les voies apoptotiques. Parmi les molécules impliquées dans la résistance à l'apoptose, les protéines membres de la famille BCL2 semblent jouer un rôle important (15–18). D'autres régulateurs classiques de l'apoptose, tels que P53 et ATM, sont également fréquemment altérés dans les cellules leucémiques, notamment par des altérations chromosomiques (19,20).

L'absence de survie des cellules de LLC en dehors de leur milieu naturel souligne également l'importance du rôle joué par le microenvironnement dans le développement de la maladie, particulièrement pour les phénomènes de migration et pour l'activation de la cellule suite à la rencontre avec l'antigène (9,21).

1.1.4. Diagnostic

Le diagnostic de LLC est le plus souvent initié de manière fortuite, suite à un bilan sanguin révélant une hyperlymphocytose. Cependant, il peut aussi être suspecté à partir de signes cliniques évocateurs comme des adénopathies, une splénomégalie, ou encore une hypertrophie amygdalienne, notamment dans les cas de lymphomes lymphocytiques. Ces signes peuvent s'accompagner de symptômes non spécifiques tels que de la fièvre, des sueurs nocturnes, une perte de poids, etc. La révélation de la maladie peut également se faire à la suite de complications (anémie, infections) et grâce aux signes cliniques correspondants (22).

La numération formule sanguine est l'examen clé du diagnostic de la « véritable » LLC. Toute lymphocytose supérieure à 5 G/L, isolée, persistant pendant plus de 3 mois doit faire rechercher une leucémie lymphoïde chronique.

Sur le frottis sanguin, on retrouve des lymphocytes matures, caractérisés par une petite taille, une bordure de cytoplasme fine, un noyau dense sans nucléole discernable et dont la chromatine est partiellement agrégée (Figure 1). On peut retrouver également associées à ces cellules matures des cellules atypiques, plus larges, clivées ou des prolymphocytes dans la limite de 55% des lymphocytes sanguins. Un excès de prolymphocytes sera en faveur d'une leucémie à prolymphocytes, pathologie distincte de la LLC. Les ombres de Gumprecht, fréquemment observées sur le frottis, correspondent à des cellules lymphoïdes lysées. Elles ne sont pas liées à un artefact de préparation des lames mais à une fragilité cellulaire, probablement révélée par les dispositifs de prélèvements sous vide. La formation de ces "smudge cells" est inversement corrélée à l'expression de la vimentine, une protéine du cytosquelette essentielle pour la rigidité et l'intégrité du lymphocyte (23). La présence d'un faible nombre d'ombres de Gumprecht serait un facteur de pronostic défavorable (24).

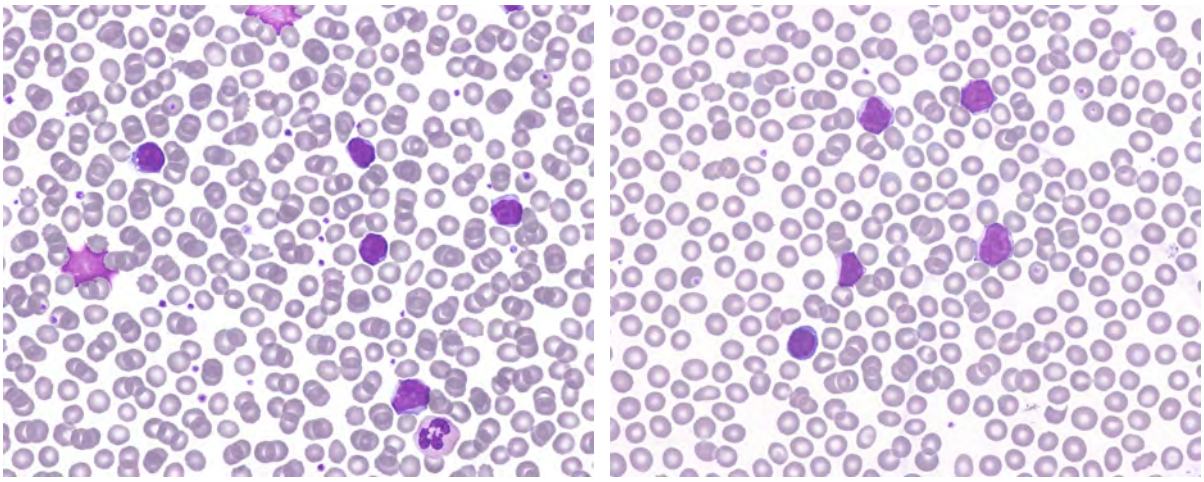

Figure 1 *- Frottis sanguin d'un patient atteint de LLC. Présence de lymphocytes matures et d'ombres de Gumprecht*

L'immunophénotypage sanguin permet de confirmer la clonalité des lymphocytes et d'éliminer les autres maladies lymphoprolifératives. Il est réalisé par cytométrie en flux (CMF), technique qui permet de détecter et de quantifier l'expression d'antigènes à la surface et dans le cytoplasme des cellules hématopoïétiques normales et pathologiques.

Les lymphocytes de LLC co-expriment :

- Des antigènes de la lignée B (CD19, CD20, CD22, CD79b). L'expression du CD20, du CD79b et du CD22 est cependant classiquement plus basse que sur les lymphocytes B normaux ;
- Le CD23, récepteur de faible affinité pour les IgE ;
- Le CD5, de façon quasi-constante et aberrante, qui est normalement retrouvé à la surface des lymphocytes T ;
- Des chaines légères d'immunoglobines Kappa (κ) ou Lambda (λ), dont l'expression est également moindre à celle des lymphocytes B non pathologiques. L'expression monotypique de l'une de ces deux chaines permet d'affirmer le caractère clonal de la LLC.

L'équipe de Matutes a mis en place, en 1994, un score, modifié en 1997, permettant de diagnostiquer une LLC et basé sur 5/6 marqueurs immunophénotypiques (25,26) (Tableau 1).

Tableau 1 *- Score de Matutes ou du Royal Marsden Hospital*

	1 POINT SI	**0 POINT SI**
CD5	+	-
CD23	+	-
CD79B	-	+
CD22	Expression négative/faible	Expression modérée/forte
FMC7	-	+
IG DE SURFACE	Expression négative/faible	Expression modérée/forte

Un score total égal à 4 ou 5 est en faveur du diagnostic de LLC typique. Seulement 5% des LLC ont un score égal à 3. Dans ce cas, le diagnostic de LLC peut être retenu exceptionnellement si le CD5, le CD23 et le CD43 sont positifs, si le CD20 est faible et si la recherche de cycline D1 est négative. Un score inférieur à 3 exclut le diagnostic de LLC (lymphomes B leucémisés).

L'antigène pan-B mature CD20 apporte un argument complémentaire pour le diagnostic de LLC lorsque son expression à la surface des cellules de LLC est plus faible que sur les cellules B normales. D'autres antigènes peuvent également être recherchés pour s'assurer du diagnostic de LLC : c'est le cas du CD43 et du CD200 qui sont très souvent exprimés sur les cellules leucémiques de LLC contrairement au CD81, exprimé préférentiellement sur les cellules d'autres hémopathies lymphoïdes. L'expression de CD38 et de ZAP-70 (Zêta Associated Protein-70) peut également être évaluée dans un but pronostique.

La biopsie ganglionnaire n'est pas recommandée en cas de présence d'une phase circulante du clone LLC. Elle est pratiquée dès que possible en cas de suspicion de lymphome lymphocytique ou en cas de suspicion de transformation en syndrome de Richter.
La réalisation d'un myélogramme ou d'une biopsie ostéo-médullaire n'est pas recommandée en première intention pour le diagnostic. Ces deux examens peuvent être effectués pour préciser l'origine de cytopénies (centrale ou périphérique).

1.1.5. Traitement

1.1.5.1. Indications de traitement

L'instauration d'un traitement est basée sur l'évaluation clinique et la présence ou non des signes de maladie active suivants (27):

- Atteinte médullaire progressive avec développement ou aggravation d'une anémie et/ou d'une thrombopénie ;
- Splénomégalie massive (6 cm au-dessous de la marge costale) ou augmentant de taille ou symptomatique ;
- Ganglions volumineux (au moins 10 cm dans le plus long diamètre) ou augmentant de taille ou symptomatiques ;
- Lymphocytose progressive avec augmentation de plus 50 % sur une période de deux mois ou temps de doublement lymphocytaire (TDL) inférieur à six mois. Chez les patients avec un chiffre initial de lymphocytes inférieur à 30×10^9/L, le TDL ne doit pas être utilisé pour définir à lui seul une indication de traitement ;
- Anémie et/ou thrombopénie immune répondant insuffisamment aux corticostéroïdes ou autres traitements usuels ;
- Signes généraux définis par la présence d'au moins un des symptômes ci-dessous, en rapport avec la maladie :
    - Perte de poids non volontaire de 10 % ou plus dans les six mois précédents,
    - Asthénie significative : index ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) à 2 ou plus ; incapacité à travailler ou effectuer les activités usuelles,
    - Fièvre de plus de 38 °C durant deux semaines ou plus sans signe d'infection,
    - Sueurs nocturnes d'une durée de plus de un mois sans signe d'infection.

Les patients nécessitant un traitement sont donc les patients en stade A et B avec des critères objectifs de maladie active, et les patients en stade C.

1.1.5.2. Molécules utilisées et recommandations

Les molécules utilisées dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique appartiennent à différentes classes d'agents anticancéreux (28):

- Agents cytostatiques :
    - Agents alkylants : chlorambucil, cyclophosphamide, bendamustine
    - Analogues de purine : fludarabine
- Anticorps monoclonaux
    - Anticorps anti-CD20 : rituximab, ofatumumab, obinutuzumab
    - Anticorps anti-CD52 : alemtuzumab
- Agents ciblant la signalisation du BCR :
    - Inhibiteur de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) : ibrutinib
    - Inhibiteur de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) : idelalisib

Le venetoclax (inhibiteur de BCL2) et le duvelisib (inhibiteur de PI3K) sont actuellement en cours d'essais cliniques.

L'ESMO (European Society for Medical Oncology) et Hallek *et al*. ont émis en 2015 des recommandations de traitement, prenant en compte les nouvelles thérapeutiques ciblées, pour les patients en première ligne de traitement (Figure 2) ou pour les malades en rechute ou réfractaires (28,29).

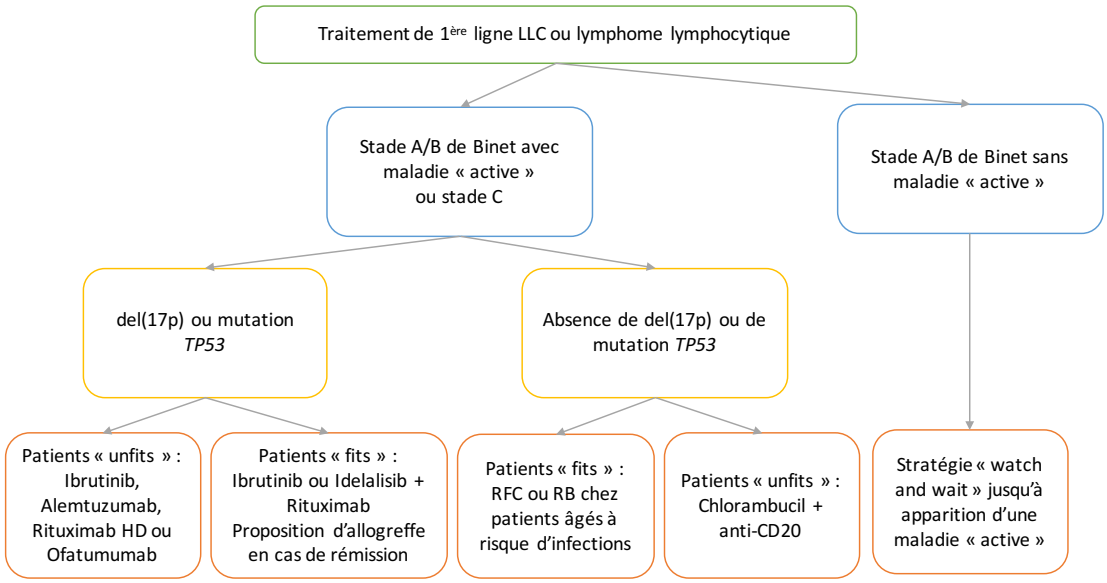

Figure 2 *- Stratégie de traitement de 1ère ligne des patients atteints de LLC ou de lymphome lymphocytique*

(HD : Haute dose, RFC : Rituximab Fludarabine Cyclophosphamide, RB : Rituximab Bendamustine)

Différents niveaux de réponse au traitement sont définis selon les critères de l'IWCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia) datant de 2008 (27) et sont résumés dans le tableau 2 :

- CR = Réponse complète,
- PR = Réponse partielle,
- PD = Maladie progressive
- RCi = CR avec récupération incomplète de la moelle (cytopénies persistantes sans lien avec la LLC d'après l'examen de la moelle osseuse),
- SD = Maladie stable : patient ne remplissant ni les critères de CR, ni ceux de PR, ni ceux de PD.

Les critères de réponse doivent être remplis deux mois après la fin du traitement.

Tableau 2 *- Critères de réponse au traitement (Hallek et al., Blood. 2008)*

Parameter	CR*	PR*	PD*
Group A			
Lymphadenopathy†	None > 1.5 cm	Decrease ≥ 50%	Increase ≥ 50%
Hepatomegaly	None	Decrease ≥ 50%	Increase ≥ 50%
Splenomegaly	None	Decrease ≥ 50%	Increase ≥ 50%
Blood lymphocytes	< 4000/μL	Decrease ≥ 50% from baseline	Increase ≥ 50% over baseline
Marrow‡	Normocellular, < 30% lymphocytes, no B-lymphoid nodules. Hypocellular marrow defines CRi (5.1.6).	50% reduction in marrow infiltrate, or B-lymphoid nodules	
Group B			
Platelet count	> 100 000/μL	> 100 000/μL or increase ≥ 50% over baseline	Decrease of ≥ 50% from baseline secondary to CLL
Hemoglobin	> 11.0 g/dL	> 11 g/dL or increase ≥ 50% over baseline	Decrease of > 2 g/dL from baseline secondary to CLL
Neutrophils‡	> 1500/μL	> 1500/μL or > 50% improvement over baseline	

Group A criteria define the tumor load, group B criteria define the function of the hematopoietic system (or marrow).
*CR (complete remission): all of the criteria have to be met, and patients have to lack disease-related constitutional symptoms; PR (partial remission): at least two of the criteria of group A plus one of the criteria of group B have to be met; SD is absence of progressive disease (PD) and failure to achieve at least a PR; PD: at least one of the above criteria of group A or group B has to be met.
†Sum of the products of multiple lymph nodes (as evaluated by CT scans in clinical trials, or by physical examination in general practice).
‡These parameters are irrelevant for some response categories.

1.2. Facteurs pronostiques

L'évolution de la leucémie lymphoïde chronique est très variable d'un individu à l'autre, en particulier chez les patients à un stade précoce de la maladie. Certains d'entre eux conservent une maladie stable pendant des années alors que d'autres évoluent rapidement vers une nécessité de traitement. De nombreuses études ont tenté d'évaluer l'impact de marqueurs biologiques et cliniques sur la survie dans la LLC. Certains d'entre eux sont importants dans la prise en charge puisqu'ils reflètent également une résistance à certains traitements. Nous allons passer en revue dans cette partie les facteurs pronostiques principaux décrits dans cette pathologie et étudiés dans ce travail.

1.2.1. Classification clinique

Deux méthodes de classification des patients sont largement utilisées dans la prise en charge de la LLC : les classifications de Rai et de Binet. Ces méthodes simples et peu couteuses, basées sur l'examen clinique et les tests de routine de laboratoire, permettent d'apprécier l'agressivité de la maladie.

Les critères de la classification de Rai sont répertoriés dans le tableau 3. Cette classification a été modifiée de façon à réduire le nombre de stades de 5 à 3 (30):

Tableau 3 - *Classification de RAI*

STADE	STADE MODIFIE (RISQUE)	DESCRIPTION
0	Faible	Lymphocytes > 5 G/L
I	Intermédiaire	Lymphocytes > 5 G/L + Adénopathie(s)
II	Intermédiaire	Lymphocytes > 5 G/L + Splénomégalie ou hépatomégalie
III	Haut	Lymphocytes > 5 G/L + Hémoglobine < 11 g/dL
IV	Haut	Lymphocytes > 5 G/L + Plaquettes < 100 G/L

La classification de Binet (Tableau 4) définit également 3 stades selon le nombre d'aires ganglionnaires atteintes (définies par une adénopathie de plus de 1 cm ou une organomégalie) et selon la présence de cytopénies (anémie ou thrombopénie) (31).

Cinq aires ganglionnaires sont définies (Figure 3) :

- Tête et cou (Aire 1)
- Axillaire (Aire 2)
- Inguinale (Aire 3)
- Foie (palpable) (Aire 4)
- Rate (palpable) (Aire 5)

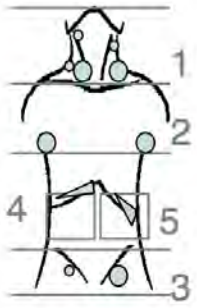

Figure 3 *- Aires ganglionnaires définies dans la classification de Binet*

Tableau 4 *- Classification de Binet*

STADE	CRITERES
A	Jusqu'à deux aires ganglionnaires atteintes
B	Plus de deux aires ganglionnaires atteintes
C	Anémie < 10 g/dL ou Thrombopénie < 100 G/L quel que soit le nombre d'aires ganglionnaires atteintes

Ces deux classifications donnent une bonne estimation du pronostic des patients atteints de LLC : la médiane de survie est supérieure à 10 ans pour les patients en stade 0 ou A, de 5 à 7 ans pour les patients en stade I-II ou B, et de 2 à 3,5 ans pour ceux en stade III-IV ou C (Figure 4).

Plusieurs études ont montré que l'administration d'agents alkylants chez les patients en stade 0 ou A n'améliorait pas la survie de ceux-ci (32,33). Une étude a également montré une augmentation de la fréquence des cancers épithéliaux chez ces patients traités à un stade précoce par rapport aux patients non traités (32). De ces études découlent la stratégie thérapeutique qui consiste à n'effectuer qu'une simple surveillance chez les patients en stade A ou 0 non symptomatiques.

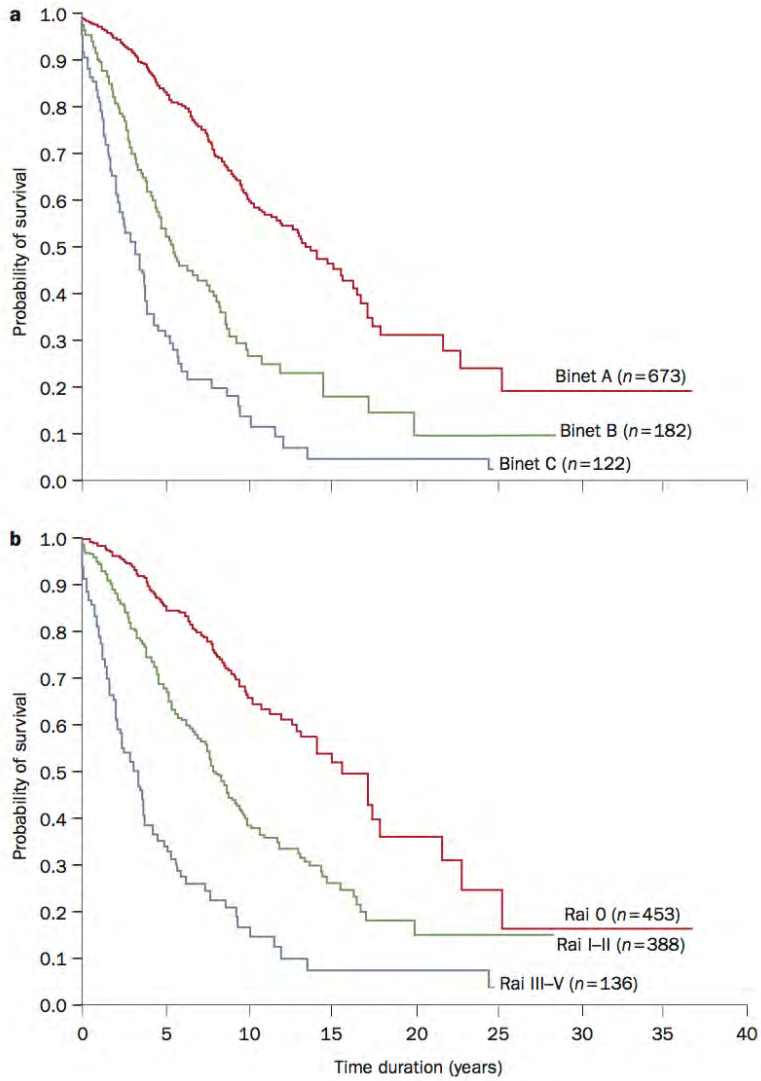

Figure 4 *- Survie globale des patients présentant une LLC selon les classifications de Binet (a) et Rai (b) (34)*

Cependant cette évaluation pronostique reste imparfaite puisqu'au sein du groupe pronostique le plus favorable, on observe un groupe de patients ayant une probabilité de survie comparable à celle du groupe de pronostic défavorable. De nombreuses études se sont attachées à décrire des facteurs pronostiques supplémentaires pouvant identifier ces patients particuliers pour lesquels une prise en charge thérapeutique plus précoce pourrait être bénéfique.

1.2.2. Cytogénétique

Les cellules de LLC sont le siège d'anomalies chromosomiques pouvant avoir un impact sur le pronostic. Ces aberrations sont le plus souvent des pertes ou des gains de matériel génétique et non des translocations comme cela peut être observé dans d'autres hémopathies lymphoïdes. La recherche de ces anomalies chromosomiques peut se faire par deux méthodes en routine : caryotype standard ou Hybridation In Situ par Fluorescence (FISH). Le développement de cette dernière depuis les années 1990 et des nouvelles techniques de stimulation pour le caryotype standard ont permis une amélioration de la sensibilité de détection des anomalies génétiques. Leur fréquence est maintenant évaluée à plus de 80% des cas (35). Les anomalies récurrentes les plus souvent observées dans la LLC sont les suivantes : délétion 13q, délétion 11q, trisomie 12, délétion 17p (36).

L'impact pronostique de ces anomalies est illustré dans la Figure 5. La délétion 17p est celle associée au moins bon pronostic, suivie de la délétion 11q, de la trisomie 12 et du caryotype normal alors que les patients présentant une délétion 13q comme seule anomalie ont le meilleur pronostic. Les médianes de survie globale pour ces 5 groupes, évaluées sur 325 patients, sont de 32, 79, 114, 111 et 133 mois et les temps avant mise sous traitement de 9, 13, 33, 49 et 92 mois respectivement (37).

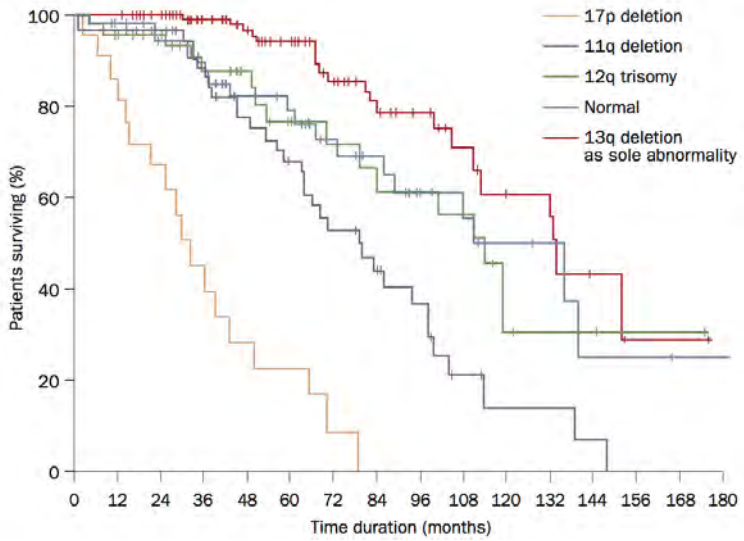

Figure 5 *- Impact pronostique des anomalies génétiques les plus fréquemment décrites dans la LLC*

1.2.2.1. Délétion 13q14

La délétion 13q est la plus fréquente des anomalies retrouvées dans la LLC (55 à 63% des cas). Cette délétion se situe en 13q14.3, au niveau des loci des gènes codant pour les micro-ARN (miRNA) miR15a et miR-16-1. Ces micro ARN régulent de façon négative le gène *BCL2*, codant pour une protéine anti-apoptotique. Ils favorisent par conséquent l'apoptose et ont un rôle de suppresseur de tumeur. L'expression de ces miRNA est fréquemment diminuée dans la LLC et semble jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie (38).

La délétion 13q14, lorsqu'elle est la seule anomalie génétique détectée, n'est pas associée à un mauvais pronostic dans la LLC (37,39). D'autres anomalies peuvent par ailleurs être en cause dans la diminution de miR15a et miR-16-1, comme des mutations ponctuelles et des phénomènes épigénétiques (40).

1.2.2.2. Trisomie 12

La trisomie 12 est observée dans 12 à 25% des cas de LLC. Un grand nombre de gènes candidats a été proposé pour expliquer les phénomènes physiopathologiques associés à cette anomalie (*MDM2*, *CDK2*, *CDK4*, ...) (41). Néanmoins, ceux-ci restent encore mal connus à l'heure actuelle.

L'impact de cette aberration chromosomique sur le pronostic de la maladie est également controversé. Considérée initialement comme un marqueur de risque intermédiaire dans le modèle proposé par Döhner *et al*., certaines études ont montré une corrélation entre la trisomie 12 et une évolution clinique plus agressive de la maladie tandis que d'autres ont tendance à considérer cette anomalie comme étant à faible risque (42–45). Des auteurs ont également décrit une association entre la trisomie 12 et la présence de lymphocytes ou d'un immunophénotypage atypiques (45).

1.2.2.3. Délétion 11q

Une délétion 11q peut être observée chez 5 à 20% des patients atteints de LLC. La région minimale délétée se situe en 11q22.3-q23.1 et correspond au locus du gène *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated)*. Ce gène joue un rôle important dans les réparations des cassures double-brins de l'ADN. La protéine ATM joue également un rôle dans la régulation de l'activité de P53, des dysfonctionnements de celle-ci pouvant être observés lors de mutations d'*ATM* (46). D'autres gènes cibles sont également évoqués pour expliquer le rôle physiopathologique de cette anomalie chromosomique (47–49).

La présence d'une del(11q) est associée à la présence d'adénopathies multiples périphériques, médiastinales et abdominales, à une progression plus rapide de la maladie avec un délai avant la mise sous traitement et une survie globale diminués, faisant de cette anomalie un marqueur pronostique défavorable (50–52).

1.2.2.4. Délétion 17p

Des anomalies de structure du bras court du chromosome 17 par délétion de la bande 17p13.1 sont retrouvées dans 5 à 8% des cas de LLC non traitées. La del(17p) peut apparaître au cours de l'évolution de la maladie ; son incidence est augmentée chez les patients réfractaires ou en rechute pour lesquels elle peut atteindre 30% des cas. La région délétée correspond au locus du gène suppresseur de tumeur *TP53*. La protéine P53 joue un rôle de suppresseur de tumeur en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose après un dommage de l'ADN (35).
De nombreuses études ont démontré l'impact pronostique majeur de cette anomalie génétique. Plusieurs auteurs ont notamment décrit une survie globale et une survie sans traitement plus courtes, ainsi qu'une mauvaise réponse aux agents alkylants et aux analogues des purines (52–60). Cette non-réponse à la chimiothérapie est expliquée par le fait que ces molécules agissent sur les cellules leucémiques par la mise en jeu de l'apoptose P53-dépendante qui est altérée en cas de délétion 17p. Les traitements alternatifs comme l'alemtuzumab, les inhibiteurs de la voie du BCR et l'allogreffe restent efficaces, ainsi que les agents cytotoxiques agissant de façon indépendante de P53 (61).
Dans la majorité des cas, la del(17p) concerne un seul allèle. La présence d'une mutation de *TP53* (4 à 37% des cas de LLC) sur la deuxième copie du gène confère un caractère particulièrement agressif et de mauvais pronostic à la maladie. Le pourcentage de cellules présentant une perte de *TP53* semble également avoir un impact sur la valeur péjorative de l'anomalie chromosomique (62).

1.2.2.5. Autres anomalies génétiques

De nombreuses autres anomalies génétiques ont été décrites dans la leucémie lymphoïde chronique.

Des délétions impliquant le bras long du chromosome 6 sont observées dans environ 7% des cas de LLC. Ces anomalies, bien qu'associées à la présence d'une lymphocytose plus élevée et d'adénopathies plus nombreuses, ne semblent pas avoir d'impact sur la survie des patients (37,63).

Des études ont également mis en évidence la présence de trisomies 19 (1,7% à 4,7% des cas), de gains des régions 2p, 8q24, 3q26 et 20q13, de délétions 14q. Ces déséquilibres sont pour la plupart considérés comme défavorables (64–72).

D'autres anomalies sont mises en évidence de façon plus rare lors de la réalisation d'un caryotype standard comme des translocations récurrentes juxtaposant les *IGH* à un gène partenaire, telles que la t(14;18)(q32;q21), la t(14;19)(q32;q13), de manière exceptionnelle la t(11;14)(q13;q32), la translocation t(2;14)(p13;q34) et la t(1;6)(p35;p25). Hormis la t(14;18) qui est associée à une évolution favorable, la présence de ces translocations chromosomiques est un facteur indépendant de mauvais pronostic dans la LLC, influençant la survie sans traitement et la survie globale (42,73,74).

La présence d'un caryotype complexe (plus de 3 aberrations chromosomiques) est également associée à une évolution péjorative de la maladie (75).

Au cours des dernières années, les techniques de séquençage nouvelle génération ont contribué à redéfinir les sous-groupes pronostiques traditionnels. En plus de la mutation de *TP53* déjà évoquée, de nouvelles mutations somatiques ayant une signification clinique ont été détectées. Parmi elles, des mutations de *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*, et *ATM* ont été observées chez 3 à 15% des patients atteints de LLC. Ces anomalies génétiques sont associées à un mauvais pronostic de la maladie (76).

1.2.3. Biologie moléculaire

Au cours du développement et de la différenciation des lymphocytes B normaux, divers changements au niveau des gènes des immunoglobulines se produisent. En particulier, on observe l'acquisition de mutations sur les gènes *IGVH*, codant pour les parties variables des chaines lourdes des immunoglobulines. Le statut mutationnel de ces gènes permet de classer les patients atteints de LLC en deux groupes de pronostics différents : un répertoire *IGVH* muté est associé à un meilleur pronostic qu'un répertoire non muté. Les patients présentant des gènes *IGVH* non mutés ont généralement une maladie plus agressive, avec des temps de rémission plus courts, une tendance à l'acquisition d'anomalies génétiques à haut risque ainsi qu'une survie globale plus courte, indépendamment du stade de la maladie (53,77–82). Une étude de Hamblin *et al*. a montré que les patients en stade A avec un statut *IGVH* muté avaient une survie médiane de 24 ans tandis qu'elle était de 7,9 ans pour les patients avec un statut non muté (83).

Une exception est à noter pour le réarrangement d'une région spécifique codée par le segment *IGVH3.21*, qui est associé à une évolution défavorable indépendamment du statut mutationnel (34).

La détermination du statut mutationnel *IGVH* peut être effectuée par détermination de la séquence nucléotidique de la région variable des immunoglobulines, obtenue préalablement après amplification par réaction de PCR à partir de l'ADN ou l'ARN extrait des cellules tumorales, et par sa comparaison avec les séquences germinales les plus proches. Les séquences présentant plus de 98 % d'homologie sont considérées comme non mutées, la base de séquences servant de référence devant tenir compte des polymorphismes et devant être régulièrement mise à jour. Ce seuil est reconnu comme étant le plus discriminant sur le plan clinique (53,84).

Le statut mutationnel semble constant au cours de la maladie. Cependant, compte tenu de la difficulté technique de l'analyse et de son coût, sa détermination est peu réalisée en routine et des marqueurs pronostiques de substitution sont recherchés. A ce jour, aucun marqueur n'a montré une correspondance absolue avec le statut mutationnel des *IGVH*.

1.2.4. Facteurs pronostiques immunophénotypiques

1.2.4.1. CD38

Le CD38 est un récepteur membranaire intervenant dans l'adhésion et la signalisation cellulaire grâce à l'interaction avec son ligand, le CD31. Sur les cellules lymphoïdes, c'est un marqueur d'activation et de maturation non spécifique de lignée. De nombreuses études ont montré l'association entre l'expression de ce marqueur et un mauvais pronostic de la maladie. Au cours de la LLC, une expression du CD38 sur les cellules leucémiques est associée à la présence de nombreux autres facteurs de mauvais pronostic (stade avancé, facteurs cytogénétiques, taux de β_2-microglobuline et de CD23 soluble (CD23s) élevés, temps de doublement lymphocytaire court, statut non muté des gènes *IGVH*). Elle est également associée à des médianes de survie sans traitement, sans progression et globale courtes et à un taux de réponse aux traitements faible (77,80,81,85–96).

Une étude concernant 118 patients de stade faible ou intermédiaire (classification Rai) a montré que parmi les patients CD38-, 75% n'avaient pas évolué à 5 ans du diagnostic contre seulement 37% des patients CD38+ (91). Il a été montré que l'association de l'expression de CD38 au statut mutationnel des gènes *IGVH* avait un pouvoir pronostique supérieur par rapport à l'un ou l'autre pris séparément (90,92).

Cependant, malgré l'accessibilité de son évaluation dans la pratique routinière, la technique permettant de mesurer son expression manque d'harmonisation. En effet, le choix du clone d'anticorps et du fluorochrome utilisé pour la technique s'avère critique et conduit à des variations au

niveau des résultats. De plus, les seuils d'interprétation pour ce marqueur ne sont pas bien définis. Différentes études ont établi un seuil de positivité à 5%, 7%, 20% ou 30%. L'existence d'une expression bimodale chez de nombreux sujets, associée à une évolution plus défavorable que si le marqueur est négatif, a également remis en cause la pertinence de ces seuils (78,97).
Par conséquent, compte tenu de l'absence de consensus technique et interprétatif, l'utilisation du CD38 comme marqueur pronostique est peu répandue en routine.

1.2.4.2. ZAP-70

ZAP-70 est une protéine kinase intracellulaire de la famille Syk exprimée principalement dans les cellules T et NK et ayant un rôle dans la cascade de signalisation intracellulaire après engagement du TCR (T-cell Receptor) et dans la signalisation du récepteur FcγRIIIa. Cette protéine peut également être exprimée dans les cellules leucémiques de LLC de façon constante au cours de la maladie.
La signification pronostique de ZAP-70 dans la LLC a été démontrée dans de nombreuses études. L'expression de ZAP-70 serait associée à une diminution des médianes de survie sans progression, sans traitement, ainsi que de la médiane de survie globale (85,98,99).
Plusieurs auteurs ont proposé d'utiliser l'expression de ZAP-70 comme marqueur de substitution du statut mutationnel des gènes *IGVH*. Cependant, l'expression de ZAP-70 ne s'est avérée qu'imparfaitement corrélée aux mutations somatiques. Selon les études, une concordance entre les deux facteurs pronostiques était observée dans 77 à 95% des cas, les cas de discordance étant considérablement plus fréquent dans les cas où des facteurs cytogénétiques de mauvais pronostic étaient présents (100–103).

Différentes techniques permettent d'évaluer l'expression de ZAP-70 (RT-PCR, immunoblot, immunocytochimie, cytométrie en flux). La cytométrie en flux est la technique la plus utilisée pour cette application. Des travaux d'harmonisation ont permis d'émettre des recommandations analytiques pour la réalisation de cette technique (104,105). Cependant, son application clinique reste actuellement limitée aux centres spécialisés et à des protocoles particuliers.

1.2.5. Marqueurs sériques

1.2.5.1. β2-microglobuline

La β_2-microglobuline est une protéine synthétisée dans l'ensemble des cellules de l'organisme. Elle se lie à la sous-unité α du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I et joue un rôle dans les phénomènes d'immunité cellulaire. Ses principaux lieux de production sont les cellules T CD8, les lymphocytes B et les cellules tumorales, qui la libèrent dans le milieu extracellulaire. Par conséquent, le taux sérique de β_2-microglobuline reflète la masse tumorale et est utilisé dans la prise en charge de nombreux cancers.

La valeur pronostique de la β_2-microglobuline dans la leucémie lymphoïde chronique a été démontrée dans de nombreuses études. Au diagnostic, chez les patients en stade A de la classification de Binet, les patients avec un taux élevé de β_2-microglobuline présentent une médiane de survie sans traitement plus courte que ceux avec des taux de β_2-microglobuline normaux (respectivement 5,3 mois *vs* non atteinte) (77). Une étude rétrospective, sur 595 patients non traités auparavant, a également montré une association entre un taux faible de β_2-microglobuline et un pourcentage de rémission complète plus élevé après traitement par fludarabine ou RFC, ainsi qu'avec une survie globale et une survie sans progression plus longues (106). Des taux anormaux de β_2-microglobuline seraient également associés à la présence d'autres facteurs pronostiques, comme une expression de CD38 et de ZAP-70 par les cellules leucémiques (85,86).

L'évaluation de la β_2-microglobuline à des fins pronostiques dans la LLC a cependant quelques inconvénients, notamment l'influence de la fonction rénale sur sa concentration.

1.2.5.2. Thymidine kinase sérique

La thymidine kinase sérique (sTK) est une enzyme impliquée dans la réplication de l'ADN. L'iso-enzyme TK1, représentant 95% de l'activité thymidine kinase, est présente dans les cellules en division alors qu'elle est absente dans les cellules quiescentes. Le niveau de l'enzyme est donc le reflet de la prolifération cellulaire et par conséquent de l'activité de la maladie.

Chez les patients atteints d'une forme précoce de LLC (stade A de la classification de Binet), il semblerait qu'un taux élevé de thymidine kinase sérique permette d'identifier un sous-groupe de patients à haut risque évolutif. La médiane de survie sans progression de ces patients est significativement inférieure à ceux présentant un taux normal de sTK (respectivement 8 mois vs 49

mois) (107). Un taux de sTK élevé est également corrélé à la présence d'autres facteurs de mauvais pronostic comme un temps de doublement lymphocytaire court, l'expression de CD38 ou de ZAP-70, la présence d'anomalies cytogénétiques ou d'un statut *IGVH* non muté (108).
Il est cependant à noter que des taux élevés de sTK peuvent être observés au cours d'infections ou en cas de déficit en vitamine B12, pouvant rendre difficile l'interprétation de ce marqueur.

1.2.5.3. CD23 soluble

Le CD23 est un récepteur de faible affinité aux immunoglobulines de type E présent de façon physiologique sur les cellules B, les cellules présentatrices d'antigène ainsi que sur les plaquettes. Un clivage protéolytique de cette glycoprotéine transmembranaire entraine le relargage de formes tronquées appelées CD23 solubles (CD23s). Le CD23s est augmenté entre 3 et 500 fois dans les sérums de patients atteints de LLC par rapport aux sujets sains. Chez les patients diagnostiqués à un stade précoce de la maladie, un taux élevé de CD23s est associé à des médianes de survie globale et de survie sans progression raccourcies (109). Une élévation du CD23s est également associée à des caractéristiques défavorables de la maladie comme une infiltration diffuse de la moelle osseuse, une forte masse tumorale, un temps de doublement lymphocytaire court (110–116).
Cependant, la variabilité très importante entre les résultats de CD23 solubles obtenus dans les différentes études est un inconvénient important de ce marqueur. Les cut-offs choisis dans les différentes publications citées pour discriminer les patients selon leur risque d'évolution varient de 50 U/mL à plus de 2000 U/mL, rendant difficile l'interprétation de ce paramètre en pratique.
La cinétique du CD23 soluble pourrait également avoir un intérêt dans la pathologie. Dans une étude concernant 56 patients en stade A, les médianes de survie sans traitement et de survie globale des patients présentant un temps de doublement du CD23s inférieur à 1 an étaient plus courtes que pour les patients avec un temps de doublement supérieur à 1 an (respectivement 20 et 83 mois *vs* 141 et 177 mois) (117).

1.2.6. Données cinétiques des cellules leucémiques

Le temps de doublement lymphocytaire correspond au temps que met le taux sanguin de lymphocytes à se multiplier par deux. Lorsqu'il est inférieur à 12 mois, il est associé à une diminution de la médiane de survie sans progression et de survie globale (118–121). Ce marqueur simple et peu coûteux reflète donc l'activité de la maladie. Cependant, son caractère rétrospectif ne permet pas de l'utiliser véritablement en tant que marqueur pronostic. Selon les recommandations de l'IWCLL, pour des taux

de lymphocytes supérieurs à 30 G/L, un temps de doublement lymphocytaire inférieur à 6 mois ou une augmentation du taux de lymphocytes supérieure à 50% en 2 mois sont des indications pour l'initiation d'un traitement.

1.2.7. Place de l'étude des marqueurs pronostiques dans la prise en charge des patients

L'évaluation de l'ensemble des facteurs pronostiques décrits précédemment n'est pas réalisée en routine, du fait du coût et de la difficulté technique de certaines analyses, notamment de l'étude du statut mutationnel des gènes *IGVH* ou encore du manque de standardisation technique et interprétatif. La recherche de délétion 17p et de mutation de *TP53* est cependant devenue indispensable avant toute décision thérapeutique.

Afin de combiner les informations apportées par les nombreux facteurs pronostiques décrits dans la leucémie lymphoïde chronique, plusieurs auteurs ont proposé d'utiliser des systèmes de scores. Récemment, plusieurs équipes se sont associées afin d'évaluer la pertinence du score CLL-IPI (Indice pronostique international de la LLC). L'étude, réalisée sur 27 facteurs pronostiques et 3472 patients, a permis d'identifier cinq facteurs pronostiques indépendants : suppression et/ou mutation de *TP53*, statut mutationnel des gènes *IGVH*, β2-microglobuline sérique, stade clinique et âge. Chaque variable a été pondérée et un score entre 0 et 10 a été calculé. Ce score a permis de définir 4 groupes de patients présentant des taux de survie globale à 5 ans significativement différents, de 93,2%, 79,3%, 63,3% et 23,3% (122). Cependant, la présence dans ce score de facteurs pronostiques difficilement évaluables en pratique (statut mutationnel *IGVH*) rend difficile son utilisation en routine.

1.3. Intérêt de l'évaluation de la maladie résiduelle dans la LLC

1.3.1. Définition de la MRD

La majorité des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique chez qui une réponse complète est observée après traitement conservent une maladie persistante, à bas niveau, non détectée par l'imagerie et les tests de laboratoire mais qui peut être démontrée sur moelle et/ou sur sang par l'évaluation de la MRD (Minimal Residual Disease). La MRD correspond au nombre de cellules leucémiques persistant dans le sang ou dans la moelle après traitement. Ces cellules résiduelles sont responsables, à plus ou moins long terme, de la rechute des patients (123). On considère que la MRD est négative pour un taux inférieur à 1 cellule leucémique pour 10 000 globules blancs ($<10^{-4}$ ou 0,01%) et positive au-delà de 0,01%.

L'évaluation de la MRD peut se faire dans le sang périphérique ou dans la moelle osseuse. Plusieurs études ont montré que certains patients avec une MRD négative dans le sang avaient une MRD positive dans la moelle (124). La détermination du taux de cellules leucémiques dans la moelle osseuse donne par conséquent plus d'informations sur la profondeur de la rémission. Compte tenu du caractère invasif du prélèvement de moelle, les recommandations de l'EMA (European Medicine Agency) proposent, dans le cadre d'essais cliniques, de déterminer dans un premier temps la MRD par cytométrie en flux (CMF) sur sang périphérique, puis sur la moelle en cas de MRD négative dans le sang. Cette évaluation doit être effectuée 3 mois après la fin du traitement, moment considéré comme le plus représentatif de l'effet du traitement.

1.3.2. Méthodes de détection de la MRD dans la leucémie lymphoïde chronique

Plusieurs techniques permettent d'obtenir la MRD.

La cytométrie en flux permet la détection des cellules leucémiques grâce à la reconnaissance d'antigènes différentiellement exprimés par les cellules de LLC et par les cellules normales. La détection des cellules se fait grâce à un panel d'anticorps couplés à des fluorochromes. La sensibilité de cette technique dépend de la quantité d'anticorps marqués utilisés : l'utilisation de 4, 6 et 8 couleurs permet respectivement l'obtention de sensibilités de l'ordre de 10^{-4} (0,01%), 10^{-5} et 10^{-6}. Cette technique est applicable aux échantillons de sang et de moelle et revêt l'avantage de sa disponibilité dans de nombreux laboratoires et de l'existence de procédures standardisées (125).

La MRD peut également être obtenue grâce à des techniques basées sur la PCR. Cette technique nécessite l'utilisation d'amorces spécifiques pour chaque patient. Avant traitement, le gène *IGVH* du clone malin est séquencé et des oligonucléotides spécifiques d'allèle (ASO) sont synthétisés pour la région *IGVH-CDR3* (gène adjacent). De cette façon, après traitement, une PCR utilisant ces amorces amplifie uniquement le gène du clone leucémique. La sensibilité obtenue avec cette technique est de l'ordre de 10^{-5}. Les avantages de cette méthode sont une sensibilité élevée, l'existence de procédures standardisées et la stabilité de l'ADN, permettant l'analyse d'échantillons conservés (126). Cependant, cette technique est difficile à mettre en place, a un coût élevé et nécessite un temps technique long.
Enfin, le taux de cellules leucémiques résiduelles peut être évalué grâce aux techniques de séquençage nouvelle génération (NGS). Dans un premier temps, le gène *IGVH* du clone leucémique du patient est séquencé sur un échantillon prélevé avant traitement. Cette étape permet l'identification de mutations spécifiques du patient analysé. Sur l'échantillon biologique prélevé après traitement, une première étape d'amplification des segments de gène *IGVH* est effectuée. Le séquençage permet ensuite d'évaluer quantitativement la fraction de cellules portant les mutations identifiées préalablement. Une cellule leucémique sur un million peut être détectée avec cette méthode (126).
Les principes, avantages et inconvénients de ces techniques sont résumés dans le tableau 5..

Tableau 5 *- Caractéristiques des différentes méthodes d'évaluation de la MRD*

	Cytométrie en flux	**PCR quantitative en temps réel**	**Next Generation Sequencing**
Principe	Détection d'antigènes de surface grâce à une combinaison d'anticorps qui permet de différencier les cellules normales des cellules leucémiques	Séquençage des gènes *IGVH* du clone leucémique du patient --> design d'oligonucléotides spécifiques pour cette région pour chaque patient --> Amplification ADN après traitement permettant de quantifier les cellules malignes	Identification de mutations spécifiques du patient dans un échantillon avant traitement --> Après traitement, amplification du gène étudié et séquençage --> mesure de la fraction de cellules portant les mutations identifiées
Sensibilité	10-4	10-4 - 10-5	< 10-5
Facteurs limitants	Présence de cellules B normales trop nombreuses Qualité des anticorps	Hypermutations somatiques Perte du gène cible	Hypermutations somatiques
Avantages	Disponible dans de nombreux laboratoires Résultats rapides Ne nécessite pas d'échantillon avant traitement	Stabilité des échantillons pour cette technique Sensibilité élevée Peu d'interférences avec les cellules B normales	Détection simultanée de plusieurs mutations Stabilité des échantillons pour cette technique, possible sur échantillons conservés Ne nécessite pas de primers spécifiques de chaque patient
Inconvénients	Nécessite des échantillons frais, Perte de sensibilité sur les prélèvements hypocellulaires	Necessité d'avoir un prélèvement avant traitement Coût élevé Temps technique long	Necessité d'avoir un prélèvement avant traitement Coût élevé

1.3.3. Impact de la présence de cellules leucémiques résiduelles sur l'évolution des patients

L'obtention d'une rémission profonde est conditionnée par les traitements et les stratégies utilisées. Les chimiothérapies incluant un anticorps monoclonal anti-CD20 sont les traitements permettant la meilleure réponse et la plus durable. Le traitement des patients par inhibiteurs de la signalisation du BCR permet une diminution rapide et importante des adénopathies et une amélioration des cytopénies. Cependant, la majorité des patients traités avec ces nouvelles thérapeutiques restent en réponse partielle et l'obtention d'une réponse complète avec une MRD négative est très rare.

Plusieurs études ont démontré la valeur pronostique indépendante de la MRD en termes de survie globale et de survie sans progression, après divers traitements (y compris allogreffe) et avec différentes stratégies d'analyse de la MRD (126).
L'étude de Kwok *et al.* s'est intéressée de façon rétrospective à 133 patients ayant atteint une réponse complète ou partielle après traitement. Une MRD négative était corrélée chez ces malades à une survie globale et une survie sans traitement plus longues indépendamment du type de traitement et des anomalies cytogénétiques présentes initialement. Le pourcentage de survie sans progression à 10 ans était de 65% pour les patients MRD- contre 10% pour les patients MRD+. La survie globale était de 70% chez les malades MRD- contre 30% chez les patients MRD+. Le temps de survie sans progression et la survie globale étaient respectivement de 7,6 et 10,6 ans pour les patients avec une MRD inférieure à 0,01%, de 3,3 et 5,3 ans pour les patients avec une MRD entre 0,01 et 1% et de 2 et 3,6 ans pour ceux avec une MRD supérieure à 1% (127).

Dans l'étude CLL8, la survie sans progression des patients MRD- était la même que les patients soient en réponse complète ou en réponse partielle. Par contre, la survie sans progression était plus longue pour les patients en réponse partielle ayant une MRD- que pour les patients en réponse complète mais MRD+ (128).

Une association claire entre le taux résiduel de cellules leucémiques et le temps de survie sans progression a donc été montrée. Dans l'étude de Kovacs *et al.*, 29,1% des patients ayant une MRD négative après traitement étaient en réponse partielle. Ceci était dû dans 48,4% des cas à une splénomégalie et dans 15,5% des cas à des adénopathies. Les patients présentant une splénomégalie avaient une survie sans progression identique aux patients ayant atteint le stade de réponse complète. Par contre, les patients conservant des adénopathies avaient une survie sans progression plus courte

(129). Cette observation montre le point faible de l'évaluation de la MRD, qui n'évalue pas la persistance de la maladie au niveau ganglionnaire.

1.3.4. Impact de l'évaluation de la MRD sur les pratiques cliniques

Le développement des techniques de détection de la maladie résiduelle pour évaluer la réponse aux traitements et l'analyse de l'impact de celle-ci sur la survie soulève de nouvelles possibilités quant à la prise en charge du patient. Celle-ci pourrait notamment être adaptée à au résultat de la MRD obtenue après traitement. Plusieurs possibilités ont été évoquées :

- En cas de MRD positive, une escalade de traitement pourrait être envisagée pour améliorer la profondeur de la rémission : ajout d'un traitement avec un mode d'action différent de celui utilisé jusqu'à présent ? Phase de consolidation ? Maintien du traitement actuel ?
- En cas de MRD négative, au contraire, une désescalade pourrait être proposée. Ceci permettrait une diminution de la toxicité, une diminution du coût du traitement, une amélioration de la qualité de vie des patients ainsi qu'une diminution de l'apparition de résistances.

Plusieurs études sont en cours afin d'évaluer l'impact de ces pratiques sur la survie des patients.
L'étude de Böttcher *et al.* a montré, pour des patients traités par RFC, que l'arrêt du traitement après 3 cycles en cas de MRD négative n'avait pas d'impact sur la survie sans progression par rapport aux patients avec une MRD négative après 6 cycles (130). Cette observation a été confirmée dans l'étude de Thompson *et al.* pour les patients présentant un statut non muté des gènes *IGVH* (131).
Varghese *et al.* ont proposé d'instaurer un traitement de consolidation par alemtuzumab chez les patients ayant une MRD positive après traitement (132). A la fin de cette consolidation, 83% des patients avaient une MRD négative dans le sang et la moelle osseuse. Six mois plus tard, 38% gardaient ce statut. Le pourcentage de survie sans progression à 5 ans pour les patients MRD- à 6 mois était plus élevé que pour les patients MRD+ (78% vs 39%). Il en était de même pour la survie globale à 5 ans (89% vs 64%). Cependant, de nombreux effets indésirables notables ont été notés durant la phase de consolidation, touchant 36% des patients.

Des études supplémentaires sont par conséquent nécessaires pour confirmer l'intérêt et l'impact de telles pratiques.

1.3.5. Place de la MRD dans la prise en charge des patients

En conclusion, l'évaluation de la maladie résiduelle permet une détermination plus précise de la profondeur de la rémission. Des stratégies de prise en charge adaptées aux résultats de la MRD pourraient voir le jour dans les années à venir. Cependant, l'évaluation de la MRD nécessite des techniques sophistiquées, coûteuses et demande un temps d'analyse relativement long. En conséquence, cette évaluation est pour l'instant réservée aux laboratoires spécialisés et n'est recommandée que pour les patients inclus dans des essais cliniques.

2. Les chaines légères libres sériques

2.1. Définition

Les immunoglobulines sont sécrétées par les plasmocytes ainsi que par d'autres cellules de la lignée B (cellules lymphoplasmocytaires, lymphocytes naïfs, activés et mémoires). Une immunoglobuline est composée de deux chaines lourdes et de deux chaines légères liées entre elles de manière covalente par des ponts disulfures. Les deux chaines lourdes et les deux chaines légères sont respectivement identiques entre elles. Chacune de ces chaines est caractérisée par une région variable (site de liaison à l'antigène) et par une région constante. Il existe deux types de chaines légères, kappa et lambda, qui diffèrent par leur région constante.

Lors de la synthèse d'une immunoglobuline normale par les cellules, les chaines légères sont produites en excès (40% de plus) par rapport à la chaîne lourde, de façon à permettre une conformation correcte de l'immunoglobuline complète (133,134). On retrouve donc dans le sérum un excès de chaines légères dites « libres ». La proportion de chaines lambda et kappa produites se situe dans un rapport de 1 pour 2.

Le rein est responsable de l'élimination plasmatique des chaines légères libres (CLL) par un mécanisme de filtration glomérulaire d'autant plus rapide que le poids moléculaire (PM) de la protéine est faible (PM κ = 25 kDa, PM λ = 50 kDa). Les chaines légères libres κ sont donc filtrées par le glomérule trois fois plus vite que les chaines légères λ. Les CLL sont ensuite réabsorbées et catabolisées au niveau du tubule proximal (135). Au total, une quantité faible de chaines légères libres est éliminée dans les urines. Les concentrations sériques normales des CLL κ et λ sont respectivement de 3,3 à 19,4 mg/L et de 5,7 à 26,3 mg/L (136).

Une production augmentée de chaines légères libres peut être observée lors d'infections chroniques ou de maladies auto-immunes, par augmentation du nombre de plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines, à l'origine d'une hypergammaglobulinémie polyclonale. Le rapport κ/λ sera dans ce cas normal, compris entre 0,26 et 1,65. Une augmentation polyclonale des chaines légères libres peut également être observée au cours d'une insuffisance rénale du fait d'une diminution de leur élimination. Les normes du ratio κ/λ sont légèrement différentes dans le cadre d'une insuffisance rénale : 0,3 à 3,3.

Au cours d'hémopathies lymphoïdes, une chaine légère libre monoclonale peut s'accumuler dans le sang, en raison d'une production excessive. Un isotype de chaine légère sera alors majoritairement retrouvé dans le sérum : le rapport κ/λ sera déséquilibré. En l'absence d'atteinte rénale, les concentrations sériques des CLL correspondent donc dans ce cas à la production de chaines légères libres par les lymphocytes B c'est-à-dire à l'activité tumorale (137).
Cependant, dès lors que la synthèse de CLL excède 10 à 30 g/j (dans le cas du myélome multiple), les capacités de réabsorption tubulaire sont dépassées et le taux urinaire de chaines légères libres s'accroît rapidement. De plus, les chaines légères libres peuvent précipiter dans les tubules distaux entraînant peu à peu la mort des néphrons à l'origine d'une diminution de la filtration glomérulaire, elle-même responsable d'une élévation de la demi-vie plasmatique des chaines légères libres. Ainsi, le taux sérique de chaines légères libres reflète non seulement l'activité tumorale mais aussi leur défaut d'élimination rénale (138).

2.2. Technique de détection/quantification

La recherche d'un excès de chaines légères libres peut être effectuée par électrophorèse des protéines. Cette technique permet la mise en évidence de la sécrétion d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum du patient. Toutefois, dans le cadre d'une recherche de chaines légères libres, cette technique est fréquemment mise en défaut du fait du faible taux de celles-ci (souvent inférieur à 2 g/L), de leur caractéristique de migration (elles peuvent migrer des α-globulines aux γ-globulines) et de leur capacité à lier d'autres protéines. Lorsqu'elles sont détectées, la quantification des chaines légères libres (sériques ou urinaires) peut se faire par densitométrie par intégration du pic lorsque celui-ci est intégrable.

L'immunofixation (IF) est une technique plus sensible, permettant à la fois de caractériser (préciser l'isotype de l'immunoglobuline entière ou de la chaine légère libre) et de confirmer le caractère monoclonal de l'anomalie décelée à l'électrophorèse. Pour caractériser le caractère « libre » des chaînes légères, il est indispensable de réaliser l'IF avec un sérum immun capable de réagir avec les chaînes légères totales « liées et libres » et avec un autre sérum immun capable de ne réagir qu'avec les chaines légères libres (le sérum immun réagit alors avec un épitope qui n'est accessible que lorsque la chaîne légère est libre).

Depuis le début des années 2000, un nouvel outil de dosage des CLL a été développé : le dosage néphélémétrique ou turbidimétrique. Ce dosage utilise un réactif composé d'anticorps polyclonaux

monospécifiques anti-CLL κ et anti-CLL λ. Ces anticorps vont reconnaître un épitope qui n'est accessible que si les chaînes légères sont libres et qui est masqué si la chaîne légère est associée à une chaîne lourde (Figure 6). La sensibilité du dosage sérique est excellente : 1,5 mg/L pour les chaines légères libres κ et 3 mg/L pour les chaines légères libres λ (Tableau 6). Le caractère monoclonal d'un isotype de chaine légère pourra alors être suspecté si le ratio κ/λ est fortement déséquilibré. Toutefois, seule une technique qualitative telle que l'IF pourra réellement affirmer la monoclonalité.

Il est à noter qu'une importante augmentation des chaines légères libres polyclonales (par exemple au cours d'une insuffisance rénale, de maladies auto-immunes, de maladies inflammatoires chroniques...) peut masquer la présence de chaines légères libres monoclonales présentes à taux faible.

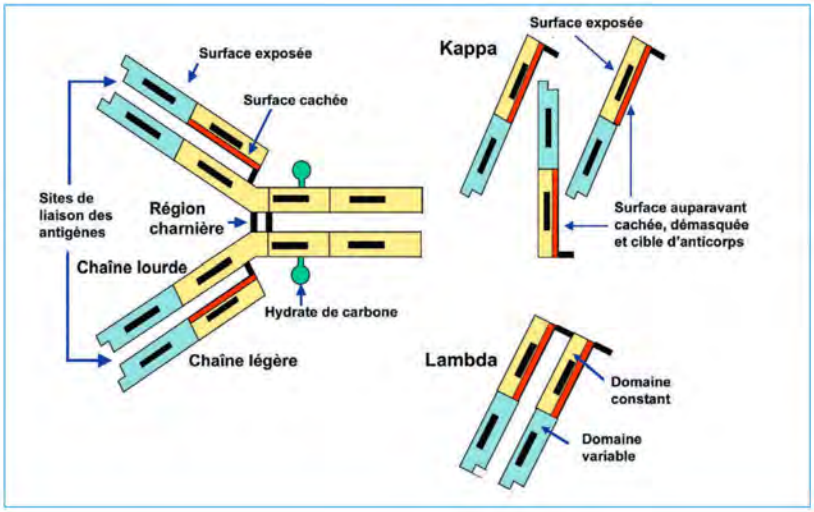

Figure 6 *- Sites de reconnaissance d'une chaine légère libre lors de la technique turbidimétrique ou néphélémétrique*

Tableau 6 *- Sensibilité des techniques pour la détection des chaines légères libres sériques*

Techniques	***Sensibilité (mg/L)***
Electrophorèse des protéines	500 - 2000
Immunofixation	150 - 500
Dosage néphélémétrique/turbidimétrique	2 - 3

2.3. Utilisation en pratique clinique

Le dosage des chaines légères libres sériques est utilisé principalement dans les gammapathies monoclonales. Ces prolifération plasmocytaires malignes correspondent à l'expansion monoclonale de plasmocytes sécrétant une immunoglobuline monoclonale. Par conséquent, une production accrue de chaines légères libres est observée dans ces pathologies. L'intérêt clinique du dosage des chaines légères libres dans ces pathologies est triple : diagnostique, pronostique et pour le suivi de la maladie :

- Lorsqu'une gammapathie monoclonale est suspectée, le dépistage se fait par électrophorèse, IF et dosage des CLL. La valeur prédictive négative d'un rapport κ/λ normal est de 98%. La sensibilité du dosage immunonéphélémétrique des CLL a permis une amélioration de la détection des myélomes « non sécrétants » (139).
- Le dosage des CLL sériques est utilisé en tant que marqueur pronostique, au diagnostic, chez les patients atteints de myélome, de plasmocytome ou de MGUS. Des scores, prenant en compte les résultats de dosage des chaines légères libres, et en particulier le rapport κ/λ, permettent de prédire l'évolution des patients atteints de ces pathologies (140). Chez les patients atteints d'amylose AL, des taux élevés de CLL sont associés à une surmortalité.
- Pour le suivi des myélomes et des amyloses AL : la demi-vie des chaines légères libres étant très courte, la réponse sérique des CLL au traitement est très rapide.

L'intérêt du dosage des CLL dans les autres hémopathies lymphoïdes a été relativement peu exploré. Cependant, plusieurs études ont montré un déséquilibre dans la production des chaines légères libres sériques dans la leucémie lymphoïde chronique et dans certains lymphomes non hodgkiniens (137). Quelques études ont également montré le potentiel pronostique du dosage des chaines légères libres sériques dans la leucémie lymphoïde chronique. Les résultats observés varient selon les publications.

Pratt *et al*., en 2008, ont dosé les chaines légères libres sériques chez 259 patients atteints de LLC, dont 181 étaient non traités. Un ratio κ/λ anormal était retrouvé dans 39% des cas. Lorsque l'ensemble des patients était analysé, cette anomalie était associée à une survie globale réduite (p = 0,002) ainsi qu'à une médiane de survie sans traitement plus courte (p = 0,001). Cependant, la différence observée si les patients non traités étaient considérés séparément n'était pas significative (p = 0,18). Les patients atteints avec un ratio κ/λ anormal étaient significativement plus susceptibles d'avoir un statut non muté des gènes *IGVH*, une positivité de ZAP-70, un temps de doublement de lymphocytes inférieur à 12 mois et une β2-microglobuline élevée (141).

Dans une étude transversale impliquant 84 patients atteints de LLC, Perdigao *et al*. ont montré une corrélation entre un ratio κ/λ anormal, des survies sans traitement et globale plus courtes, ainsi qu'avec le statut non muté des gènes *IGVH*.

Une autre étude, prospective, publiée par Maurer *et al*. en 2014, a montré une association entre une anomalie du dosage des chaines légères libres quelle qu'elle soit (observée chez 49% des patients) avec un temps de survie sans traitement raccourci (Figure 7) (142).

Yegin *et al*. ont étudié l'impact du dosage des chaines légères libres sériques sur le pronostic de la LLC chez 101 patients atteints de la maladie. 54,5% des patients présentaient des taux élevés de CLL et 29,7% un ratio κ/λ anormal. Dans cette étude, les médianes de survie globale et de survie sans traitement étaient plus courtes chez les patients avec des taux de CLL élevés (respectivement *p*=0,01 et *p*=0,02). Un ratio κ/λ anormal était également associé à une survie globale raccourcie (143).

Morabito *et al*., en 2011, ont mis en évidence une association entre un ratio de chaines légères libres anormal, une durée de survie sans traitement plus courte et la présence de nombreux facteurs pronostiques péjoratifs tels que le stade, l'expression de CD38 et ZAP-70, et les mutations *IGVH*. Au-delà d'un seuil établi à 60,6 mg/L, la somme des chaines légères libres kappa et lambda était également associée à un temps de survie sans traitement raccourci. De plus, ce paramètre était associé à la présence d'autres facteurs pronostiques péjoratifs et notamment des facteurs de risque cytogénétiques (144).

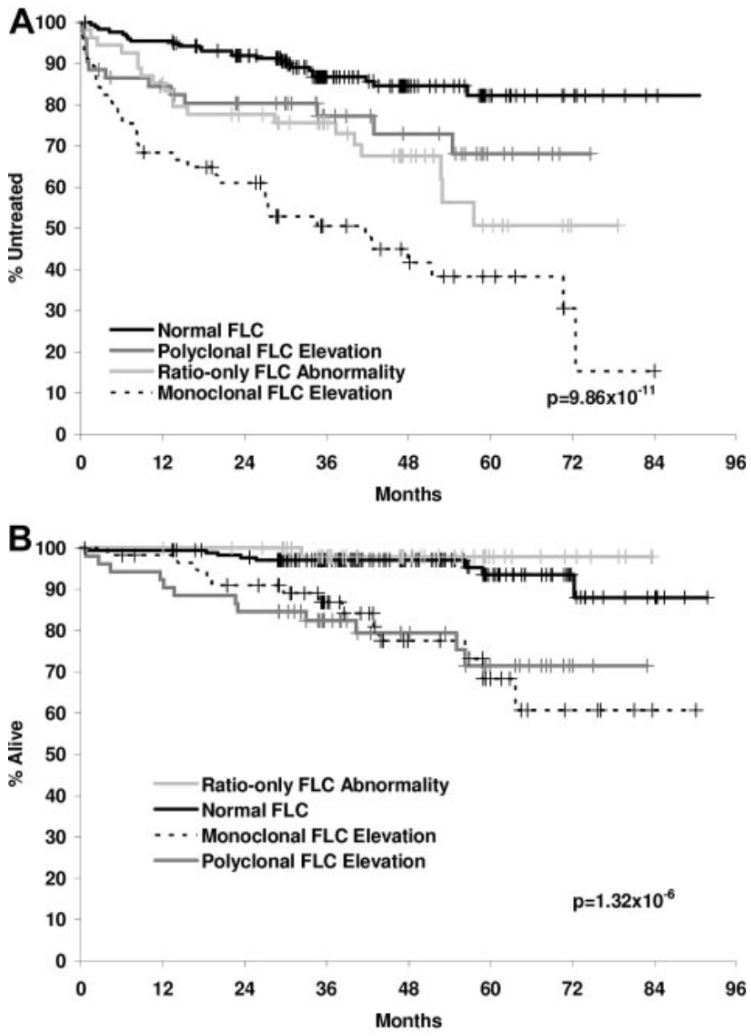

Figure 7 *- Survie sans traitement et survie globale selon la présence d'anomalies du dosage des chaines légères libres sériques. Maurer et al. (142)*

3. Problématique et objectifs

En conclusion, la leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie fréquente avec une évolution très hétérogène selon les patients, notamment pour ceux diagnostiqués en stade précoce. De nombreux facteurs pronostiques ont été étudiés pour évaluer la survie des patients atteints de la maladie. Cependant, en pratique, en raison des difficultés des techniques de dosage, de leur coût et de l'absence de standardisation au niveau technique ou interprétatif, l'utilisation de ces marqueurs n'est pas réalisée en routine et reste souvent réservée aux patients inclus dans des essais cliniques.

Plusieurs études ont montré le potentiel impact pronostic des dosages des chaines légères libres sériques dans la LLC. Nous nous proposons, avec cette étude, d'évaluer l'intérêt de ces marqueurs chez des patients au diagnostic et au cours du suivi de la maladie.

Les objectifs de cette étude sont :

- D'évaluer la valeur pronostique des taux de chaines légères libres sériques ainsi que des paramètres en découlant (ratio κ/λ, somme $\kappa+\lambda$) au moment de la prise en charge initiale des patients,
- De déterminer la relation entre ces marqueurs et les autres facteurs pronostiques défavorables déjà décrits tels que le stade de la maladie, les anomalies cytogénétiques, l'expression de ZAP-70 et du CD38, ou encore les dosages de β2-microglobuline, de CD23s et de thymidine kinase sérique.
- D'évaluer l'intérêt du dosage des chaines légères libres sériques dans le suivi de la maladie en étudiant la relation entre celles-ci et la maladie résiduelle.

II. Matériels et méthodes

1. Patients

Sur la période d'octobre 2007 à décembre 2016, un dosage des chaines légères libres sériques a été réalisé pour 267 patients suivis à l'institut Bergonié pour une leucémie lymphoïde chronique ou un lymphome lymphocytique. Une analyse des données de ces patients au diagnostic et au cours du suivi de la maladie a été effectuée.

2. Recueil de données

Les données démographiques (âge, sexe) ainsi que les données médicales des patients ont été recueillies à partir des courriers d'hospitalisation grâce au logiciel Hopital Manager. Les données biologiques ont été extraites du logiciel Hexalis (système informatique du laboratoire). Ont été retenus pour la base de données :

- La date du diagnostic,
- Les traitements reçus, leur date, la réponse observée,
- La date de dernier suivi,
- L'évolution à long terme,
- Les dosages de chaines légères libres sériques,
- La présence ou non d'une insuffisance rénale,
- Les caractéristiques immunophénotypiques des lymphocytes sanguins au diagnostic,
- Les points de suivi de la maladie résiduelle,
- Les données cytogénétiques au diagnostic ou à la rechute,
- Les dosages de β2-microglobuline,
- L'électrophorèse des protéines sériques et la présence ou non d'une immunoglobuline monoclonale,
- L'expression de CD38,
- L'expression de ZAP-70,
- Les dosages de sTK,
- Les dosages de CD23s.

Le calcul du temps de survie sans traitement a été mesuré entre la date du bilan initial et la date d'instauration du traitement ou de fin de suivi si aucun traitement n'avait été administré à cette date.

L'introduction d'un traitement de l'hémopathie avait été décidée de façon collégiale, selon les recommandations de l'IWCLL.

3. Marqueurs biologiques

3.1. Dosage de chaines légères libres sériques

La mesure du taux de chaines légères libres sériques κ et λ a été effectuée par technique turbidimétrique sur module c501 de l'automate Cobas® c6000 (Roche Diagnostic), selon les recommandations du fournisseur de réactif (coffret Freelite®, The Binding Site). Les dosages ont été réalisés sur sérum, obtenu après centrifugation de sang prélevé sur tube sec.
La technique consiste à mettre en présence l'échantillon à doser avec une solution d'anticorps anti-CLL κ ou λ. Un faisceau de lumière traverse la cuvette réactionnelle et la diffusion de la lumière augmente au cours de la formation des complexes immuns insolubles. L'anticorps est introduit en excès de façon à ce que la quantité de complexes immuns formée soit proportionnelle à la concentration d'antigène. Cette technique nécessite une calibration préalable, effectuée grâce à des solutions dont la concentration en antigène est connue.
Les valeurs normales utilisées pour l'analyse étaient celles préconisées par le fournisseur, pour κ de 3,3 à 19,4 mg/L, pour λ de 5,7 à 26,3 mg/L, et pour le rapport κ/λ de 0,26 à 1,65 sans insuffisance rénale et de 0,3 à 3,3 avec insuffisance rénale (clairance de la créatinine calculée par la formule MDRD inférieure à 60 mL/min).

3.2. Cytométrie en flux : diagnostic, évaluation de la MRD, expression de CD38 et ZAP-70

Le principe de l'immunophénotypage par cytométrie en flux consiste à déterminer la présence d'antigènes cellulaires à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à des molécules fluorescentes. Les cellules en suspension sont injectées dans une buse qui permet le passage cellule à cellule devant un ou plusieurs faisceaux laser. Ces derniers vont exciter les molécules fluorescentes qui vont émettre une lumière détectée selon sa longueur d'onde.

Cent microlitres d'une suspension cellulaire contenant environ 500 000 leucocytes dilués dans du Facsflow (BD-Biosciences, ref. 342003) ont été déposés par tube. La suspension cellulaire était mise en contact pendant quinze minutes à l'obscurité avec les anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes requis (BD-Biosciences, Beckman-Coulter et DAKO). Les hématies ont été lysées par

ajout d'1 mL de Versalyse (Beckman-Coulter, ref. A09777). Après dix minutes d'incubation supplémentaire à l'obscurité, les tubes étaient passés sur le cytomètre.
Pour la détermination des chaînes légères ou lourdes des immunoglobulines de surface, le sang était lavé 2 fois dans du Facsflow avant incubation avec les anticorps.
L'étude a été réalisée sur le cytomètre en flux Beckman-Coulter Navios®, et l'interprétation des données sur le logiciel CXP Cytometer® (Beckman-Coulter).

La cytométrie en flux a permis le diagnostic de LLC chez les patients grâce aux panels d'anticorps couplés aux fluorochromes suivants :

- Tube 1 : CD45-KO, CD3-PB, CD19-AA750, CD56-AA700, CD79b-APC, CD5-PC7, CD14-PC5.5, CD4-ECD, CD23-PE et enfin CD8-FITC
- Tube 2 : CD45-KO, FMC7-PB, CD19-AA750, CD3-APC, CD5-PC5.5, CD20-ECD, Kappa-FITC, Lambda-PE

Un autre mix d'anticorps a permis une orientation au moment du diagnostic (expression d'autres marqueurs non inclus dans le score de Matutes), l'évaluation de l'expression du CD38, et l'évaluation de la MRD au cours du suivi des patients. Ce panel comprenait les couples anticorps-fluorochromes suivants : CD45-KO, CD3-PB, CD19-AA750, CD22-AA700, CD79b-APC, CD200-PC7, CD5-PC5.5, CD38-ECD, CD43-PE, CD81-FITC.
Un cut-off de 30% de cellules positives a été choisi dans cette étude pour discriminer les LLC CD38+ de celles CD38-.
Enfin, la CMF a permis de déterminer l'expression de ZAP-70 au diagnostic grâce au panel d'anticorps suivant : CD45-KO, CD5-APC, CD19-PC7, ZAP-70-PE. Un cut-off de 20% de cellules positives a été retenu pour l'analyse.

3.3. FISH

L'hybridation in situ par fluorescence est une technique de cytogénétique permettant de détecter la présence d'altérations chromosomiques au sein de cellules fixées sur lame, grâce à des sondes couplées à un marqueur fluorescent.

Dans un premier temps, un pré-traitement des cellules avec du formaldéhyde à 3,7% durant 2 minutes a permis la perméabilisation des membranes des cellules et la fixation. Le formaldéhyde était ensuite éliminé par lavage dans un tampon. Des sondes d'intérêt double brin directement marquées par un fluorochrome étaient ensuite appliquées sur la lame. Des sondes (Abott®) ciblant les gènes suivants ont été utilisées : *TP53* (Vysis LSI p53 (17p13.1) pour la détection de la del(17p), *RB* (Vysis LSI 13 (RB1))

pour la détection de la del(13q), *ATM* (Vysis LSI ATM 11q22.3) pour la détection de la del(11q), et le centromère du chromosome 12 (CEP12) (Vysis LSI CEP12) pour la détection de la trisomie 12. Les trois premières sondes ont été utilisées diluées au 1/20ème. La sonde CEP12 a été utilisée diluée au ½. 10 µL de sonde étaient appliqués sur une surface de 25 mm grâce à une lamelle ronde. L'ensemble lame et lamelle était ensuite scellé.

Les lames préparées étaient déposées dans l'Hybridizer (Dako ®) et subissaient les programmes de dénaturation et d'hybridation suivants :

- Sondes *TP53*, *RB*, *ATM* : dénaturation à 73°C pendant 3 minutes puis hybridation à 37°C durant 24 à 48h
- Sonde CEP12 : dénaturation à 73°C pendant 3 minutes puis hybridation à 42°C durant 24 à 48h.

A l'issue de cette phase, un lavage stringent à 65°C pendant 8 minutes a permis d'éliminer les sondes non liées et le marquage non spécifique. Les lames étaient ensuite plongées dans un tampon de lavage 2 fois pendant 3 minutes. Pour chaque lame, 10 µL de DAPI étaient déposés grâce à une lamelle. La lecture était effectuée sur un microscope à épifluorescence après 15 minutes minimum.

3.4. Autres dosages

La β2-microglobuline a été dosée par méthode immunoturbidimétrique sur l'automate Cobas® 6000 (Roche Diagnostics), conformément aux recommandations du fournisseur. Dans cette étude, un taux de β2-microglobuline supérieur à 2,4 mg/L a été considéré comme anormal.
La mesure du CD23 soluble a été effectuée par technique ELISA (Human soluble CD23 ELISA Kit, Invitrogen). Selon les recommandations du fournisseur, un CD23 soluble supérieur à 3,3 U/mL était considéré comme anormal. Cependant, en raison de la positivité de 54 dosages sur 55 et de la grande variabilité des seuils considérés dans les études, un nouveau cut-off a été calculé grâce à une courbe ROC. Un seuil à 73 U/mL permettait de différencier les patients traités des non traités avec le meilleur rapport sensibilité/spécificité.
Les taux de thymidine kinase sérique ont été mesurés par méthode immunologique sur l'automate Liaison® (Diasorin). Conformément aux recommandations du fournisseur, un taux de sTK supérieur à 7,5 U/L était considéré comme anormal.
L'électrophorèse des protéines sériques a été effectuée sur Minicap® (Sebia) et a permis de déterminer le taux de gammaglobulines.

4. Données statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur les logiciels GraphPad Prism v7 et IBM SPSS Statistics. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les variables quantitatives. La comparaison des proportions a été réalisée en utilisant le test exact de Fisher. La réalisation d'une courbe ROC a permis de déterminer le seuil de la somme $\kappa+\lambda$ permettant de discriminer les patients traités des patients non traités à la fin du suivi. L'analyse des temps de survie sans traitement a été effectuée en utilisant la méthode de Kaplan-Meier. Le test du log-rank a permis de calculer la significativité de l'association entre les variables et la survie. L'impact pronostique a également été évalué grâce à des analyses univariées et multivariées avec le modèle de régression de Cox. Les résultats ont été exprimés en utilisant le Hazard Ratio (HR) et l'intervalle de confiance (IC) à 95% de celui-ci. Une valeur de *p* inférieure ou égale à 0,05 était considérée comme significative pour l'ensemble des calculs statistiques.

III. Résultats

1. Etude de l'impact pronostique du dosage de chaines légères libres sériques au diagnostic

1.1. Caractéristiques cliniques et biologiques des patients analysés

Les dosages de chaines légères libres ont été effectués chez 192 patients au moment de la prise en charge initiale de leur LLC. Le tableau 7 résume les caractéristiques cliniques et biologiques de ce groupe de malades. Les 192 patients étudiés étaient naïfs de tout traitement pour leur hémopathie.

La médiane d'âge des patients étudiés était de 67 ans. Le ratio H/F était environ de 1,1. La grande majorité des malades était diagnostiquée au stade A de la classification de Binet (78,1%).

A la fin de l'étude et avec une médiane de suivi de 2 ans et demi, 74 patients (38,5%) avaient reçu un traitement et 9 malades étaient décédés. Les analyses de survie globale n'ont pas pu être effectuées du fait de ce faible taux de mortalité.

Tableau 7 *- Principales caractéristiques cliniques et biologiques de patients étudiés au diagnostic*

Paramètre	Nombre de patients	Pourcentage
Age		
Médiane	67 ans	
Minimum-maximum	34 - 86	
Temps de suivi		
Médiane	30 mois	
Minimum-maximum	0 - 107	
Traitement		
Patients traités (ultérieurement)	74	38,5%
Sexe	*192*	
Femme	92	47,9%
Homme	100	52,1%
Stade selon Binet	*192*	
A	150	78,10%
B	34	17,70%
C	8	4,20%
FISH	*167*	
Anormale	104	62,3%
Délétion 13q	74	43,5%
Trisomie 12	29	17,3%
Délétion 11q	18	10,5%
Délétion 17p	12	6,9%
β2-microglobuline	*118*	
Normale	70	59,3%
Augmentée	48	40,7%
TK sérique	*52*	
Normale	20	38,5%
Augmentée	32	61,5%
CD23 soluble	*55*	
Normal	36	65,5%
Augmenté	19	34,5%
Expression de ZAP-70	*77*	
Négative	47	61,0%
Positive	30	39,0%
Expression de CD38	*186*	
Négative	170	91,4%
Positive	16	8,6%
Taux de lymphocytes		
Moyenne	23,5 G/L	
Minimum-maximum	0,94 - 294 G/L	
Electrophorèse		
Hypogammaglobulinémie <6g/L	19/91	20,9%

1.2. Répartition des anomalies de dosage de chaines légères libres sériques au diagnostic de la maladie

L'évaluation du taux de chaines légères libres a été effectuée au diagnostic pour les 192 patients. Chez les patients présentant une insuffisance rénale (clairance de la créatinine selon la formule MDRD inférieure à 60 mL/min), les normes du ratio kappa/lambda ont été ajustées conformément aux recommandations du fournisseur (0,3 – 3,3).

Le tableau 8 résume les caractéristiques des dosages de chaines légères libres sériques des patients étudiés, selon la survenue ultérieure d'un traitement ou non.

Tableau 8 *- Anomalies de dosage des chaines légères libres sériques selon l'instauration ultérieure ou non d'un traitement*

Paramètre		Tous	Patients traités (74)	Patients non traités (118)
Taux de chaine légère libre κ				
	Médiane (mg/L)	14,41	18,80	13,41
	Minimum-maximum	1,1 - 196,62	1,1 - 196,62	5,72 - 107,57
	Nombre augmenté	59	35	24
	Nombre diminué	2	2	0
Taux de chaine légère libre λ				
	Médiane (mg/L)	12,00	14,30	11,50
	Minimum-maximum	1,63 - 200,8	1,63 - 200,8	2,51 - 47,35
	Nombre augmenté	19	15	4
	Nombre diminué	6	4	2
Ratio κ/λ				
	Médiane	1,20	1,41	1,17
	Minimum-maximum	0,034 - 44,15	0,034 - 44,15	0,38 - 16,83
	Nombre augmenté	58	33	25
	Nombre diminué	7	7	0
Somme κ+λ				
	Médiane (mg/L)	29,15	39,54	25,96
	Minimum-maximum	11,55-215,52	11,55-215,52	13,06-113,96
	Nombre augmenté	55	40	15

Différentes anomalies ont pu être observées :

- Elévation monoclonale (κ et/ou λ élevé avec ratio anormal) : 50 patients (26,0%)
    - Elévation du taux d'une CLL avec rapport anormal : 47 patients (24,5%)
    - Elévation du taux des 2 CLL avec ratio anormal : 3 patients (1,55%)
- Elévation polyclonale des CLL (κ et/ou λ élevé avec ratio normal) : 22 patients (11,5%)
    - Elévation du taux d'une CLL avec rapport normal : 19 patients (9,9%)
    - Elévation du taux des 2 CLL avec ratio normal : 3 patients (1,55%)
- Anomalie du ratio isolée : 15 patients (7,8%)
- Sans anomalie de dosage des CLL : 105 patients (54,7%)

Au diagnostic, 65 patients présentaient une anomalie du ratio κ/λ (33,8%), 58 avec un rapport augmenté et 7 avec un ratio diminué, traduisant respectivement une surproduction de CLL κ et λ. Parmi les 58 patients avec un ratio élevé, 48 présentaient une monotypie κ à l'immunophénotypage sanguin, 4 une anomalie λ et aucune expression des chaines légères n'était détectée en cytométrie pour 4 autres. Pour les patients présentant un ratio κ/λ diminué, la présence d'une monotypie λ à l'immunophénotypage était observée dans 6 cas sur 7, aucune expression des chaines légères n'étant détectée en cytométrie pour le dernier patient. Le pourcentage de non concordance entre l'anomalie présente sur le ratio κ/λ et la monotypie observée à l'immunophénotypage était par conséquent de 6,5%. Parmi les 4 cas discordants, un seul patient avec un rapport augmenté présentait un pic IgG κ à l'électrophorèse. Aucun de ces patients ne présentait d'insuffisance rénale. Les 4 patients avec un discordance présentaient également un taux élevé de chaine légère libre sérique κ.

A la fin de l'étude, un traitement avait été instauré chez :

- 68% des patients présentant une élévation monoclonale des CLL au diagnostic,
- 55% de ceux présentant une élévation polyclonale,
- 46,7% des malades avec une anomalie isolée du ratio,
- 21% de ceux sans anomalie des dosages de CLL.

Les temps médians de survie sans traitement étaient respectivement de :

- 3 mois pour les patients avec une élévation monoclonale
- 14 mois pour ceux avec une élévation polyclonale des CLL
- 28 mois pour les malades avec une anomalie du ratio isolée

La médiane de survie sans traitement n'était pas atteinte pour les patients sans anomalie de dosage des CLL.

Les temps de survie sans traitement des patients sans anomalie étaient plus longs que pour les malades présentant l'une des trois anomalies décrites (respectivement $p < 0{,}0001$, $p < 0{,}0001$ et $p = 0{,}0015$). En revanche, il n'existait pas de différence significative entre les temps de survie sans traitement des patients présentant des anomalies des dosages de chaines légères ($p > 0{,}05$, Figure 8).

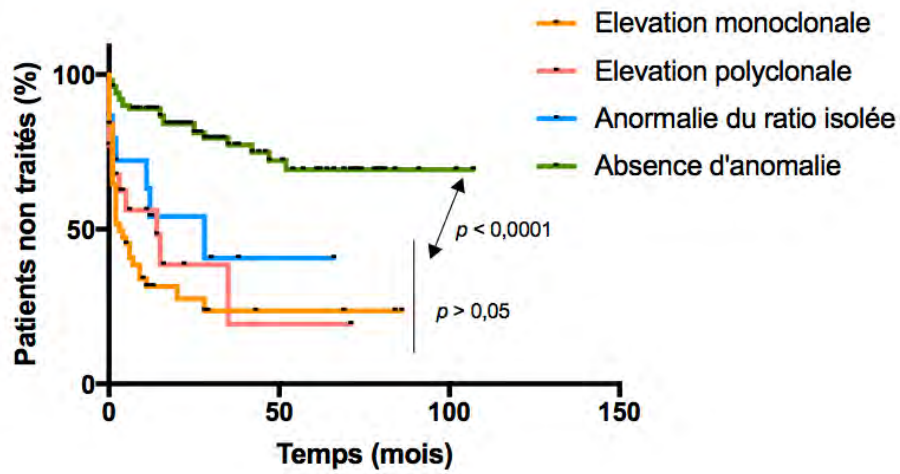

Figure 8 *- Temps de survie sans traitement selon la présence d'anomalies de dosage des chaines légères libres sériques*

1.3. Analyse de la valeur pronostique du ratio κ/λ et de la somme κ + λ

1.3.1. Survie sans traitement des patients selon la présence d'une anomalie du ratio κ/λ

Un déséquilibre du ratio κ/λ traduit l'accumulation dans le sérum d'un type de chaine légère libre pouvant être consécutive à l'accumulation d'un clone de lymphocytes B. Un rapport κ/λ anormal peut donc refléter l'activité tumorale de la maladie. Nous avons donc souhaité analyser la valeur pronostique d'une anomalie du ratio κ/λ au diagnostic, indépendamment de la présence d'une anomalie des taux de chaines légères κ et λ.

Les médianes du ratio κ/λ des patients traités et non traités, respectivement de 1,41 et 1,17, n'étaient pas statistiquement différentes (test de Mann-Whitney, p = 0,125). En effet, les anomalies de ce rapport se situant de part et d'autre des valeurs normales, elles influent peu sur la médiane obtenue.

Avant la fin de l'étude, 61,5% des patients avec un ratio κ/λ anormal avaient reçu un traitement contre 26,8% des patients avec un rapport κ/λ normal (p < 0,0001). Les patients présentant une anomalie du rapport κ/λ avaient une médiane de survie sans traitement de 6 mois alors qu'elle n'était pas atteinte pour les patients sans anomalie du ratio (p < 0,0001, Figure 9).

Cette différence était également retrouvée lorsque l'analyse portait uniquement sur les patients en stade A (classification de Binet) : pour les patients avec un ratio κ/λ anormal et ceux présentant un ratio normal, les médianes de survie étaient respectivement de 28 mois et non atteinte (p < 0,001, Figure 10). Pour ces malades, les taux de traitement en fin d'étude étaient de 33,3% pour un ratio anormal et de 18,4% pour un ratio normal (p = 0,0682).

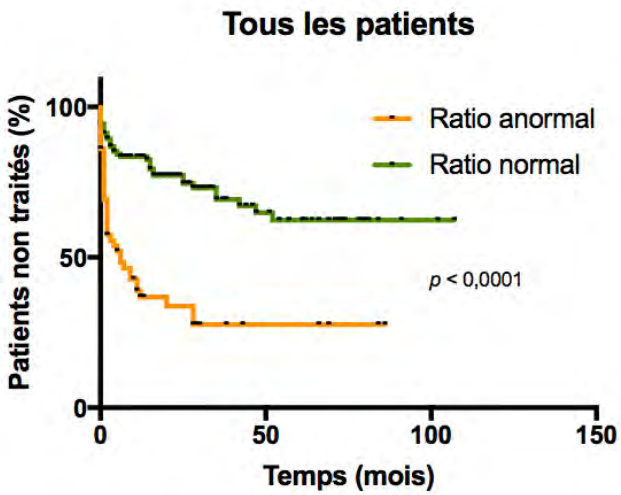

Figure 9 *- Survie sans traitement des patients présentant ou non une anomalie du ratio chez tous les patients au diagnostic*

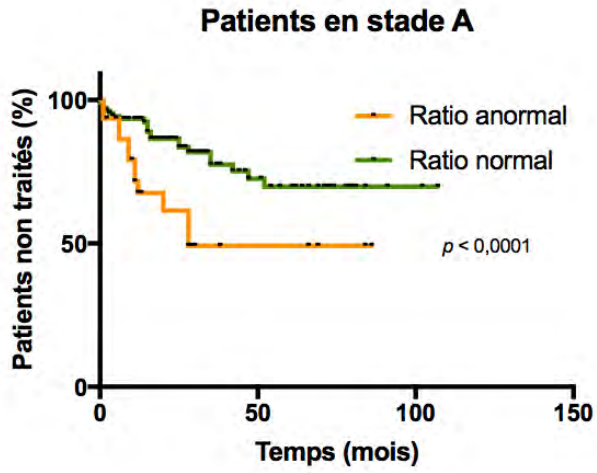

Figure 10 *- Survie sans traitement des patients présentant ou non une anomalie du ratio, chez les patients en stade A*

Dans le but d'affiner l'analyse, les patients ont été divisés en 3 groupes : ratio anormal en faveur d'une anomalie λ (7 patients), ratio anormal en faveur d'une anomalie κ (58 patients) et ratio normal (127 patients). Pour ces 3 groupes, les médianes de survie sans traitement étaient respectivement de 3 mois, 11 mois et non atteinte. Cependant, la différence observée entre les patients présentant une surproduction de λ par rapport à ceux présentant une surproduction de κ n'était pas significative (Figure 11).

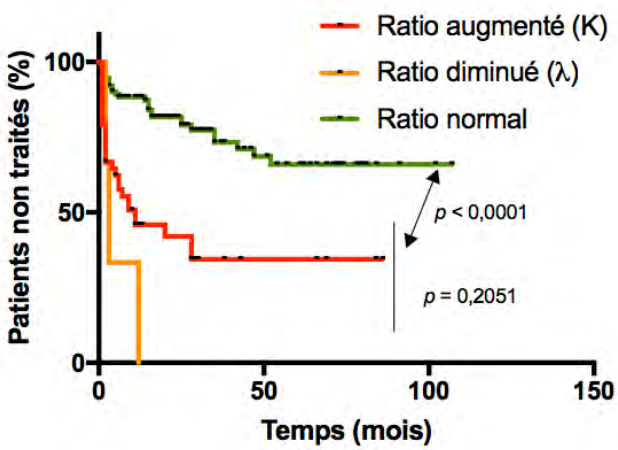

Figure 11 *- Survie sans traitement selon la présence d'une anomalie en faveur d'une surproduction de kappa ou lambda*

1.3.2. Recherche d'une valeur seuil de κ+λ permettant de discriminer les patients traités des patients non traités

Morabito *et al*. ont montré dans une étude publiée en 2011 l'intérêt pronostique de la somme des chaines légères libres κ et λ. Au-delà d'un seuil établi à 60,6 mg/L, ce marqueur était associé à un mauvais pronostic et corrélé à d'autres facteurs pronostiques défavorables. Nous avons souhaité, dans la continuité de cette publication, évaluer l'intérêt pronostique de cette nouvelle variable.

Au sein de notre cohorte, la médiane de ce marqueur κ+λ était de 29,15 mg/L (minimum : 11,55 mg/L, maximum : 215,52 mg/L). De la même façon que dans l'étude de Morabito *et al.*, une valeur seuil permettant de discriminer les patients traités des patients non traités a été déterminée. La courbe ROC obtenue (aire sous la courbe : 0,74, $p < 0,001$) a permis de définir un seuil à 38,4 mg/L, discriminant les patients avec un sensibilité de 54,1% et une spécificité de 87,3%. Au-delà de ce seuil, 15 patients sur 55 étaient non traités (27,3%) ; 103 patients sur 137 (75,2%) n'avaient pas reçu de traitement pour une somme κ+λ inférieure à 38,4 mg/L ($p < 0,0001$).

1.3.3. Analyse des temps de survie sans traitement des patients présentant un taux de κ+λ augmenté

Les taux de κ+λ étaient significativement supérieurs chez les patients traités pendant l'étude (39,54 mg/L) par rapport aux patients non traités (25,96 mg/L, $p < 0,0001$).

La médiane de survie sans traitement pour les patients avec un taux de κ+λ supérieur ou égal à 38,4 mg/L était de 4 mois alors qu'elle n'était pas atteinte pour les patients avec un taux inférieur à 38,4 mg/L ($p < 0,0001$, Figure 12).
Cette différence était également observée sur l'analyse des patients en stade A au diagnostic (médianes de survie de 15 mois *vs* non atteinte pour κ+λ ≥ 38,4 mg/L et κ+λ <38,4 mg/L respectivement, $p < 0,0001$, Figure 13). Pour ces mêmes malades, le taux de traitement à la fin de l'étude était de 16,9% pour ceux avec κ+λ<38,4 mg/L et de 46,2% pour ceux avec κ+λ ≥ 38,4 mg/L ($p = 0,003$).

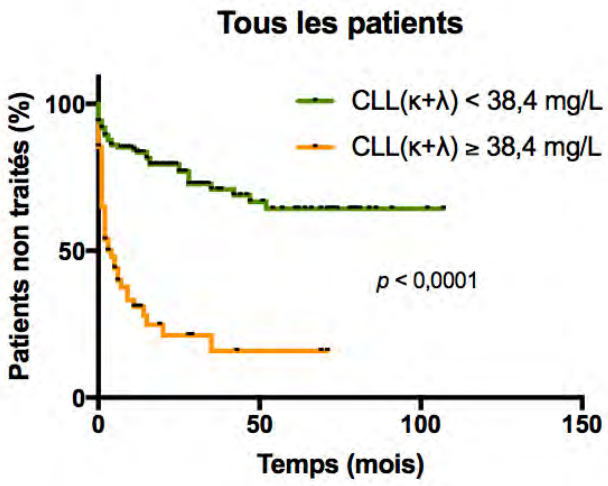

Figure 12 *- Temps de survie sans traitement des patients présentant ou non une anomalie de κ+λ chez tous les patients au diagnostic*

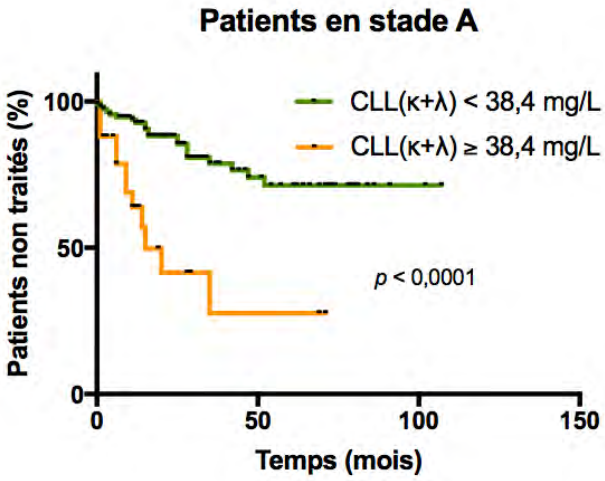

Figure 13 *- Temps de survie sans traitement des patients présentant ou non une anomalie de κ+λ, chez les patients en stade A*

1.3.4. Etude de la relation entre le ratio κ/λ et la somme κ+λ

Les patients ont été divisés en 4 groupes selon les anomalies de dosage des chaines légères libres présentes (Figure 14) :

- κ/λ et κ+λ normaux (110 patients, 57,3%)
- κ/λ anormal et κ+λ normal (27 patients, 14,1 %)
- κ/λ normal et κ+λ anormal (17 patients, 8,9%)
- κ/λ et κ+λ anormaux (38 patients, 19,8%)

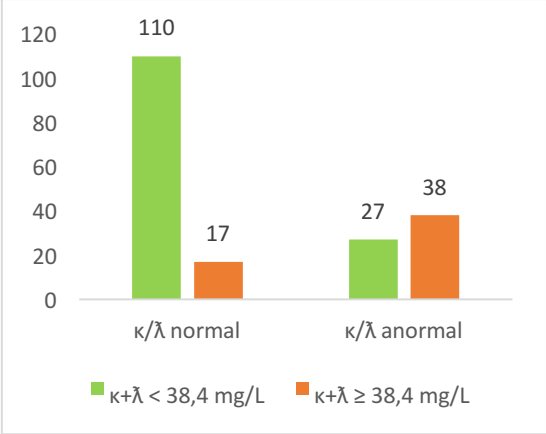

Figure 14 *– Nombre de patients présentant des anomalies de la somme κ+λ selon le résultat du ratio κ/λ*

Les médianes de survie sans traitement, pour ces 4 groupes, étaient respectivement non atteinte, de 28, 14 et 2 mois (p < 0,001,Figure 15). Il existait une différence significative entre les groupes « κ/λ et κ+λ normaux » et les trois autres groupes ainsi qu'entre les groupes « κ/λ et κ+λ anormaux » et « κ/λ anormal et κ+λ normal » (p = 0,0199). La présence d'une augmentation de la somme κ+λ semblait donc être de moins bon pronostic qu'une anomalie du ratio κ/λ.

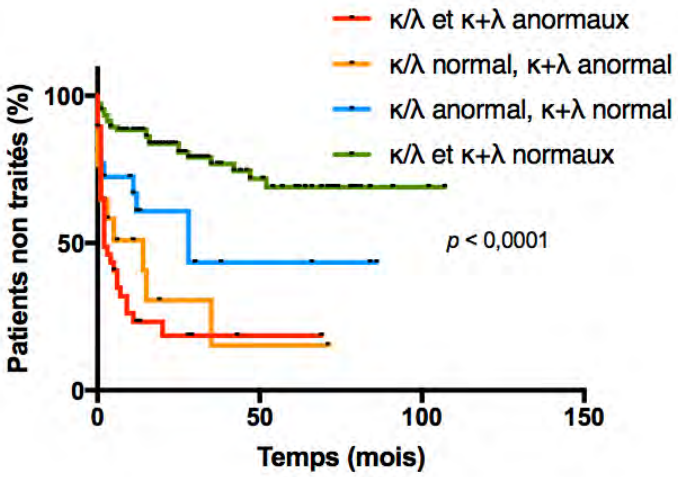

Figure 15 *- Survie sans traitement selon la présence d'anomalies de κ/λ et κ+λ*

1.4. Analyse des relations entre les anomalies de dosage des chaines légères libres sériques et les autres facteurs pronostiques

1.4.1. Etude de l'impact des facteurs pronostiques déjà décrits sur la survie sans traitement

Afin de comparer la valeur pronostique des chaines légères libres à celle des autres marqueurs péjoratifs précédemment décrits, nous avons dans un premier temps vérifié leur impact sur la survie sans traitement chez les patients au diagnostic.

Les pourcentages de patients ayant reçu un traitement étaient significativement plus élevés pour ceux présentant au diagnostic : une maladie à un stade avancé, une anomalie cytogénétique de type del(17p) ou del(11q) (cytogénétique défavorable) et trisomie 12 (cytogénétique intermédiaire), des taux élevés de β2-microglobuline, thymidine kinase sérique ou CD23 soluble, une expression significative de ZAP-70 (Tableau 9).
Chez les patients diagnostiqués en stade A, seule la présence d'une trisomie 12, d'un taux de CD23 soluble élevé ou d'une expression de ZAP-70 étaient associées à un taux de traitement plus élevé (Tableau 9).

Tableau 9 *- Pourcentage de patients traités à la fin de l'étude selon les résultats des différents facteurs pronostiques*

Paramètre	Tous les patients			Patients en stade A		
	Traités Nb (%)	Non traités Nb (%)	*p*	Traités Nb (%)	Non traités Nb (%)	*p*
Stade Binet						
A	33 (17,2)	117 (60,9)	< 0,0001	/	/	/
B & C	41 (21,3)	1 (0,5)		/	/	
Del(17p) ou del(11q)						
Absence	52 (30,2)	91 (52,9)	0,0122	24 (18,3)	91 (69,5)	0,1988
Présence	18 (16,9)	11 (6,4)		6 (4,6)	10 (7,6)	
t12						
Absence	47 (28,0)	92 (54,8)	0,0029	19 (14,8)	91 (71,1)	0,0242
Présence	19 (11,3)	10 (5,9)		8 (6,3)	10 (7,8)	
β2m						
Normale	23 (19,5)	47 (39,8)	< 0,0001	14 (16,5)	47 (55,3)	0,0623
Augmentée	34 (26,6)	14 (10,9)		11 (12,9)	13 (15,3)	
TK sérique						
Normale	5 (9,6)	15 (28,8)	0,0441	4 (9,5)	15 (35,7)	0,3166
Augmentée	18 (34,6)	14 (27,0)		9 (21,4)	14 (33,3)	
CD23 soluble						
Normal	8 (14,6)	28 (50,9)	< 0,0001	6 (13,9)	28 (65,1)	0,0014
Augmenté	17 (30,9)	2 (3,6)		7 (16,3)	2 (4,7)	
CD38						
Négatif	63 (33,9)	107 (57,5)	0,4199	30 (20,7)	106 (73,1)	0,6843
Positif	8 (4,3)	8 (4,3)		1 (0,7)	8 (5,5)	
ZAP-70						
Négatif	14 (18,2)	33 (42,8)	0,0004	5 (8,8)	33 (57,9)	0,0011
Positif	22 (28,6)	8 (10,4)		11 (19,3)	8 (14,0)	

Des taux élevés de β2-microglobuline, de thymidine kinase sérique, de CD23s, l'expression de ZAP-70, et la présence d'une anomalie cytogénétique de type del(17p) et trisomie 12 étaient associés à un temps de survie sans traitement plus court. L'expression du CD38 semblait en revanche non discriminante pour l'analyse du délai avant mise sous traitement des patients (Tableau 10). Chez les patients en stade A, le taux thymidine kinase sérique ne permettait pas de discriminer les patients à risque d'évolution rapide.

Tableau 10 *- Impact des différents facteurs pronostiques sur la survie sans traitement (NA : Non Atteinte)*

Paramètre	Tous les patients		Patients en stade A	
	Temps médian de survie sans traitement (mois)	***p***	**Temps médian de survie sans traitement (mois)**	***p***
Cytogénétique				
Caryotype normal ou del(13q)	NA	< 0,0001	NA	0,0036
Trisomie 12	7		44,5	
Del(17p) ou del(11q)	16		35	
β2m				
Normale	NA	< 0,0001	NA	0,0079
Augmentée	5		35	
TK sérique				
Normale	NA	0,029	NA	0,2433
Augmentée	20		NA	
CD23 soluble				
Normal	NA	< 0,0001	NA	0,0002
Augmenté	3		15	
CD38				
Négatif	NA	0,2396	NA	0,576
Positif	28		NA	
ZAP-70				
Négatif	NA	0,0001	NA	0,0001
Positif	11		28	

1.4.2. Corrélation entre la présence d'anomalies de dosage des chaines légères libres sériques et la présence d'autres facteurs pronostiques péjoratifs

La présence d'une anomalie du ratio κ/λ était associée de façon significative à un stade avancé de la maladie (B ou C selon la classification de Binet), à des taux de β2-microglobuline et de CD23s augmentés et à la présence d'une trisomie 12. En revanche, le déséquilibre du ratio n'était pas corrélé de façon significative à la présence d'une anomalie cytogénétique de mauvais pronostic (del(11q) ou del(17p)), à l'expression de CD38 et de ZAP-70, et à l'augmentation des taux de thymidine kinase sérique (Tableau 11).

Une augmentation de la somme κ+λ était significativement associée à une maladie diagnostiquée à un stade avancé, à la présence d'une anomalie cytogénétique défavorable (del(17p), ou del(11q)) ou intermédiaire (trisomie 12), à des taux augmentés de β2-microglobuline, thymidine kinase sérique, CD23 soluble ainsi qu'à une expression de ZAP-70 par les cellules leucémiques (Tableau 11).

Tableau 11 *- Relation entre les anomalies du ratio κ/λ et de la somme κ+λ avec différents marqueurs pronostiques de la LLC*

Paramètre		**Ratio K/L**			**Somme K/L**		
		Normal Nb (%)	**Anormal Nb (%)**	***p***	**Normale Nb (%)**	**Anormale Nb (%)**	***p***
Stade Binet							
	A	114 (59,4)	36 (18,8)	< 0,0001	124 (64,6)	26 (13,5)	< 0,0001
	B & C	13 (6,8)	29 (15,1)		13 (6,8)	29 (15,1)	
del(17p) ou del(11q)							
	Absence	95 (55,2)	48 (27,9)	0,999	106 (61,6)	37 (21,5)	0,0464
	Présence	19 (11,1)	10 (5,8)		16 (9,3)	13 (75,6)	
Trisomie 12							
	Absence	100 (59,5)	41 (24,4)	0,0015	107 (63,7)	34 (20,3)	0,0021
	Présence	10 (6,0)	17 (10,1)		12 (7,1)	15 (8,9)	
β2m							
	Normale	52 (44,1)	18 (15,3)	0,018	59 (50,0)	11 (9,3)	< 0,0001
	Augmentée	25 (21,2)	23 (19,4)		20 (16,9)	28 (23,7)	
TK sérique							
	Normale	17 (32,7)	3 (5,8)	0,1182	18 (34,6)	2 (3,9)	0,0268
	Augmentée	20 (38,5)	12 (23,1)		19 (36,5)	13 (25,0)	
CD23 soluble							
	Normal	30 (54,5)	6 (10,9)	0,025	31 (56,4)	5 (9,1)	0,0013
	Augmenté	10 (18,2)	9 (16,4)		8 (14,5)	11 (20,0)	
CD38							
	Négatif	115 (61,8)	55 (29,6)	0,0951	124 (66,7)	46 (24,7)	0,0803
	Positif	7 (3,8)	9 (4,8)		8 (4,3)	8 (4,3)	
ZAP-70							
	Négatif	34 (44,2)	13 (16,9)	0,321	38 (49,4)	9 (11,7)	0,0372
	Positif	18 (23,4)	12 (15,6)		17 (22,1)	13 (16,9)	

1.4.3. Comparaison des facteurs pronostiques

Les résultats de l'analyse univariée selon le modèle de Cox étaient concordants avec les résultats des analyses de survie sans traitement déjà décrits (Analyse de Kaplan-Meier, Tableau 10). Les Hazard Ratios des différents marqueurs significativement associés à un risque plus élevé de débuter un traitement sont répertoriés dans le tableau 12.

Tableau 12 *– Résultats de l'analyse univariée selon le modèle de régression de Cox pour l'ensemble des facteurs pronostiques étudiés*

Paramètre	Tous les patients			Patients en stade A		
	HR	**IC 95%**	***p***	**HR**	**IC 95%**	***p***
Stade avancé	19,949	11,419-34,853	< 0,001	/	/	/
del(17p) ou del(11q)	2,069	1,207-3,547	0,008	2,099	0,853-5,168	0,107
Trisomie 12	2,289	1,342-3,905	0,002	2,775	1,214-6,341	0,016
B2m	3,258	1,9-5,587	< 0,001	2,785	1,255-6,181	0,012
TK sérique	2,827	1,047-7,632	0,04	1,988	0,611-6,466	0,253
CD23 soluble	7,69	3,237-18,271	< 0,001	6,208	2,052-18,777	0,001
ZAP-70	3,376	1,715-6,645	< 0,001	6,175	2,132-17,885	< 0,001
CD38	1,535	0,734-3,208	0,255	0,533	0,073-3,908	0,536
Ratio κ/λ	3,656	2,291-5,834	< 0,001	2,826	1,380-5,789	0,005
Somme κ+λ	4,98	3,097-8,007	< 0,001	4,588	2,224-9,465	< 0,001

En analyse multivariée, seuls une augmentation de la somme κ+λ (HR = 3,368, IC = 1,120-10,131, *p* = 0,031), l'expression de ZAP-70 (HR = 5,696, IC = 1,482-21,893, *p* = 0,011) et un taux élevé de CD23s (HR= 3,416, IC = 1,148-10,164, *p* = 0,027) étaient indépendamment associés au risque de mise sous traitement, après ajustement selon les données de β2-microglobuline, sTK, ratio, cytogénétique et âge (36 patients).

Pour les 26 patients en stade A ayant eu l'ensemble des dosages de facteurs pronostiques, seule l'expression de ZAP-70 était indépendamment associée au risque de mise en traitement (HR=30,709, IC=1,798-524,531, *p*=0,018).

1.5. Etablissement d'un score prédictif de la survie sans traitement

Grâce aux données recueillies, un score clinico-biologique a été établi dans le but de prédire, au moment du diagnostic, l'évolution des patients et leur probabilité de devoir débuter un traitement. Les facteurs pronostiques facilement réalisables et les plus discriminants pour le délai de mise sous traitement ont été choisis pour ce score. 1 point était attribué pour chaque facteur de mauvais pronostic présent parmi les suivants : stade B ou C de Binet, β2-microglobuline augmentée et somme κ+λ supérieure à 38,4 mg/L. Le score final était la somme de ces points.

3 catégories étaient alors définies :

- Groupe à haut risque : score 2 ou 3
- Groupe à risque intermédiaire : score à 1
- Groupe à faible risque : score à 0

Ce score permettait de stratifier le risque de nécessité de traitement de façon équilibrée. Les médianes des temps de survie sans traitement pour les 3 groupes étaient respectivement de 2, 35 mois et non atteinte (p <0,0001, Figure 16).

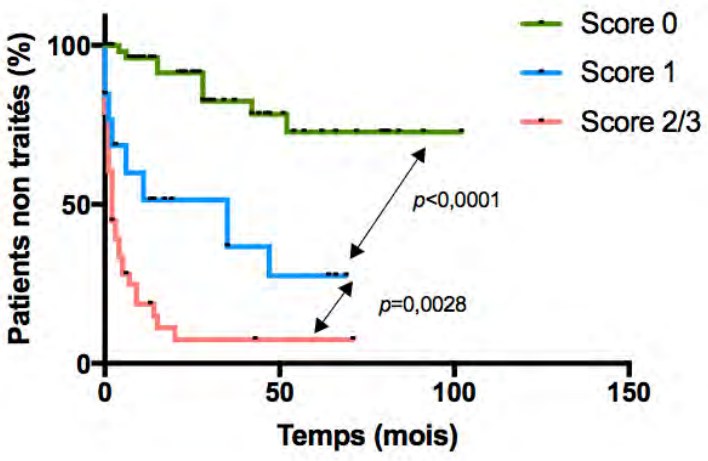

Figure 16 *- Survie sans traitement selon les résultats du score établi*

1.6. Impact de la lymphocytose et de l'hypogammaglobulinémie sur les résultats

Les chaines légères libres étant produites par les cellules B, nous avons souhaité nous assurer de l'absence de corrélation entre le taux de chaines légères libres et le taux de lymphocytes B.

De façon surprenante, les patients avec un ratio normal et des lymphocytes B inférieurs à 5 G/L au diagnostic avaient une médiane de survie sans traitement plus courte que les patients avec un ratio normal et une hyperlymphocytose B. Toutefois, les patients avec un taux de lymphocytes B inférieur à 5 G/L et un ratio anormal avaient une médiane de survie moindre que ceux avec un ratio normal. De plus, cette particularité n'était pas retrouvée pour la survie sans traitement selon la présence ou non d'une anomalie de la somme κ+λ, sur laquelle le taux de lymphocytes CD19+ n'a pas d'influence (Figure 17). Les survies sans traitement avec ou sans hyperlymphocytose B, indépendamment des anomalies des chaines légères libres ne montraient pas de différence significative (p = 0,9107). Il n'existait par ailleurs pas de corrélation significative entre le taux de lymphocytes B et la somme κ+λ (y=0,0004x+30,525, R^2 = 0,138).

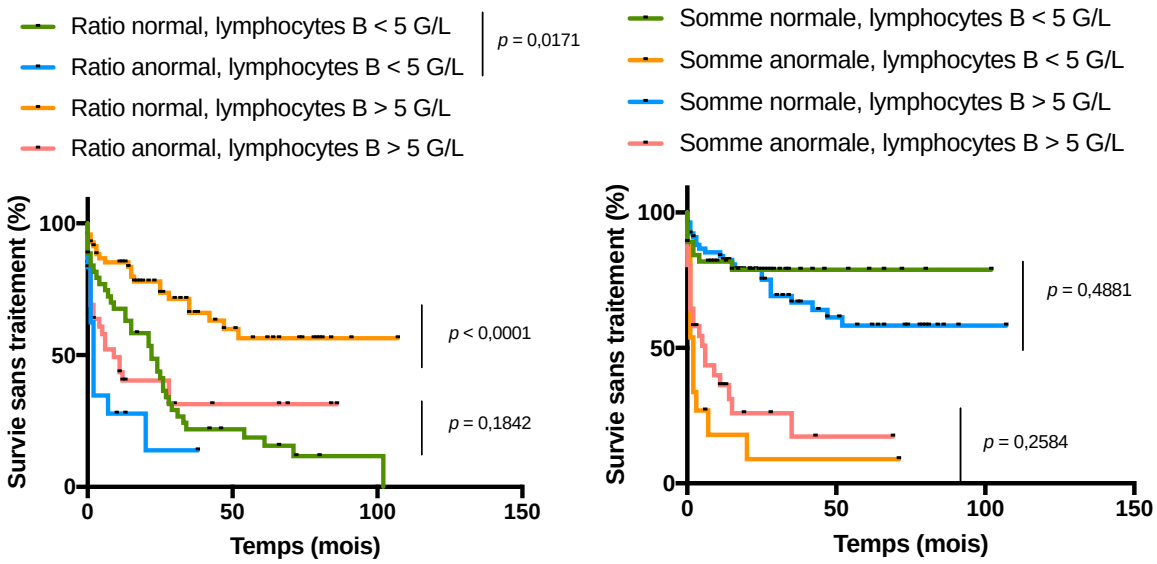

Figure 17 *- Impact de la lymphocytose B sur la valeur pronostique des anomalies des chaines légères libres sériques*

De la même façon que pour la lymphocytose B, nous avons analysé l'impact d'une hypogammaglobulinémie inférieure à 6 g/L sur la valeur pronostique des chaines légères libres sériques. Aucune influence de l'hypogammaglobulinémie sur la valeur pronostique du ratio κ/λ et de la somme κ+λ n'a été mise en évidence (Figure 18).

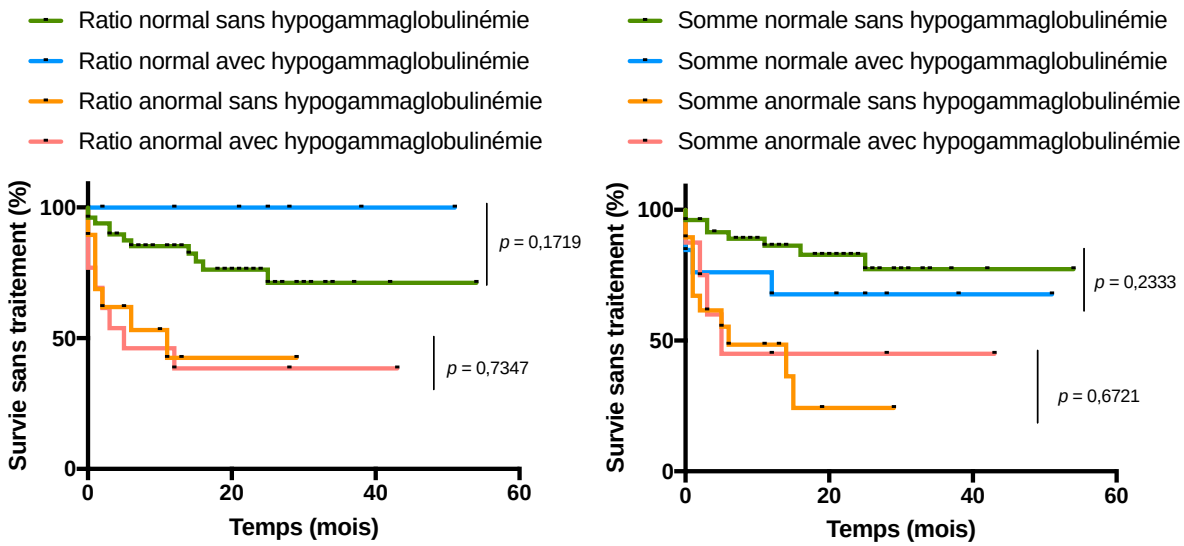

Figure 18 *- Impact de l'hypogammaglobulinémie sur la valeur pronostique des anomalies de dosage des chaines légères libres*

2. Etude de l'intérêt du dosage des chaines légères libres sériques dans le suivi de la maladie

2.1. Données concernant les patients analysés

391 évaluations de la MRD ont été effectuées de façon concomitante à des dosages de chaines légères libres, chez 111 patients déjà traités auparavant, permettant d'évaluer la relation entre celles-ci et le taux de cellules leucémiques résiduelles dans le sang. Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients concernés sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 13). Ces analyses faisaient suite à différents traitements : RFC, R-bendamustine, chlorambucil, ibrutinib, duvelisib, R-idelalisib, alemtuzumab, ofatumumab et RCHOP.

Tableau 13 *- Caractéristiques cliniques et biologiques des patients ayant eu une évaluation de la MRD simultanément à un dosage de CLL*

Paramètre		**Nombre de patients**	**Pourcentage**
Age			
	Médiane	65 ans	
	Minimum-maximum	37-88	
Sexe			
	Femme	49	44,1%
	Homme	62	55,9%
Stade selon Binet au diagnostic			
	A	55	49,5%
	B	43	38,8%
	C	13	11,7%
Temps de suivi			
	Médiane	79 mois	
	Minimum-maximum	0 - 178	
Nombre de lignes de traitement			
	Médiane	2	
	Minimum-maximum	1 - 9	

2.2. Relation entre MRD et anomalies du dosage des chaines légères libres sériques

Chez ces patients traités auparavant, 14,8% des MRD négatives étaient associées à un rapport κ/λ anormal tandis que 37,0% des patients avec une MRD positive (> 0,01%) présentaient une anomalie de ce ratio (*p* = 0,0006). La valeur prédictive positive (VPP) de l'anormalité du ratio était de 93,1% (Sensibilité 37,0%, Spécificité 85,2%) (Figure 19).

Une somme κ+λ supérieure ou égale à 38,4 mg/L permettait de détecter la présence d'une MRD positive avec une valeur prédictive positive de 92,0% (Sensibilité 24,2%, Spécificité 88,5%). Une somme κ+λ anormale était présente pour 11,5% des bilans avec une MRD négative et pour 24,2% de ceux avec une MRD positive (p=0,0291) (Figure 19).

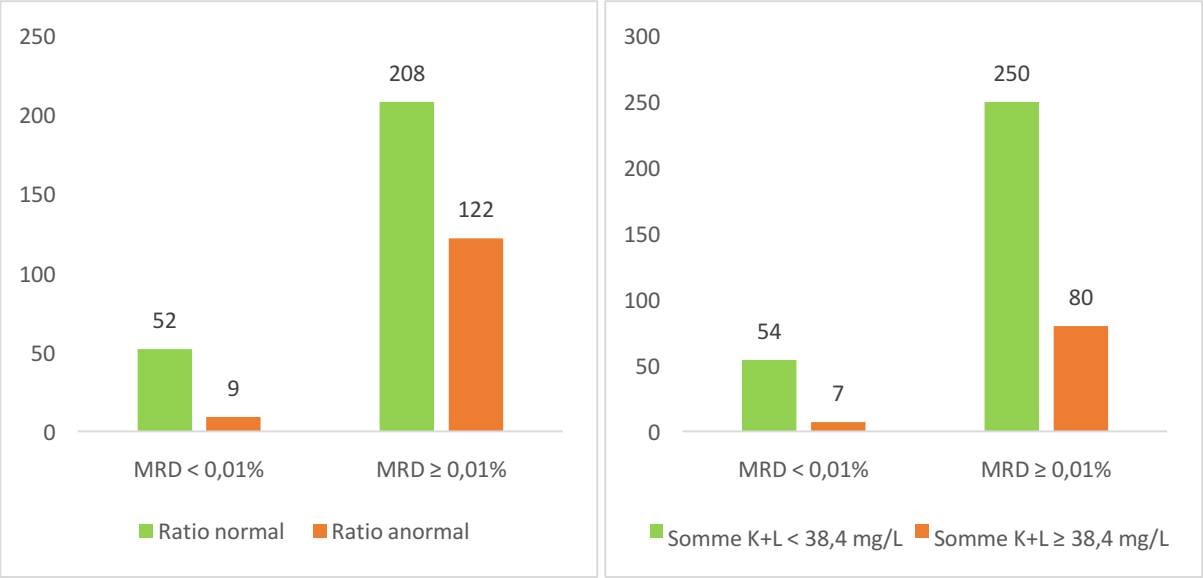

Figure 19 *- Relation entre les anomalies de dosage des chaines légères libres et la positivité de la MRD*

Parmi ces dosages, 84 avaient été effectués dans les suites immédiates du traitement (0 à 6 mois plus tard) et permettaient donc d'évaluer la réponse à celui-ci. Un ratio anormal était observé dans 15,6% des cas de MRD négative et dans 46,2% des cas de MRD positive. La valeur prédictive positive du ratio vis-à-vis de la MRD était de 82,8% (Sensibilité 46,2%, Spécificité 84,4%, VPN 49,1%). La somme anormale, quant à elle, permettait de prédire la persistance de cellules leucémiques à un taux significatif avec un VPP de 90,5% (Sensibilité 36,5%, Spécificité 93,8%, VPN 47,6%).

Les mêmes analyses statistiques ont ensuite été effectuées pour un seuil de MRD à 1%. Ce changement entrainait une baisse de la spécificité et donc de la VPP mais permettait d'augmenter la sensibilité et la valeur prédictive négative (VPN) : un ratio normal et une somme inférieure à 38,4 mg/étaient respectivement associés dans 83% et 93,6% des cas à une MRD inférieure à 1% (Tableau 14).

Tableau 14 *- Evaluation de la concordance entre la présence ou non de cellules leucémiques résiduelles et d'anomalies de dosage des chaines légères libres sériques selon deux seuils de MRD*

	MRD < 0,01% Nb (%)	**MRD ≥ 0,01%** Nb (%)	**MRD < 1%** Nb (%)	**MRD ≥ 1%** Nb (%)
Analyse du ratio				
Ratio normal	27 (32,1%)	28 (33,4%)	39 (46,4%)	8 (9,5%)
Ratio anormal	5 (5,9%)	24 (28,6%)	16 (19,1%)	21 (25,0%)
Analyse de la somme				
Somme K+L < 38,4 mg/L	30 (35,7%)	33 (39,3%)	44 (52,4%)	3 (3,6%)
Somme K+L ≥ 38,4 mg/L	2 (2,4%)	19 (22,6%)	19 (22,6%)	18 (21,4%)

Sur les 84 patients étudiés, 44 avaient nécessité un nouveau traitement avant la fin de l'étude. La médiane de temps de suivi pour ces patients à partir de la date du bilan de MRD était de 23 mois. Les patients avec un ratio κ/λ anormal avaient une médiane de survie sans traitement (temps avant traitement suivant) inférieure aux patients avec un rapport κ/λ normal (respectivement 51 et 5 mois, *p* = 0,007). Les mêmes observations pouvaient être faites pour la somme κ+λ. La médiane de survie sans traitement des patients avec une somme anormale était de 1 mois alors qu'elle était de 37 mois pour ceux avec une somme inférieure à 38,4 mg/L (*p* = 0,003) (Figure 20).

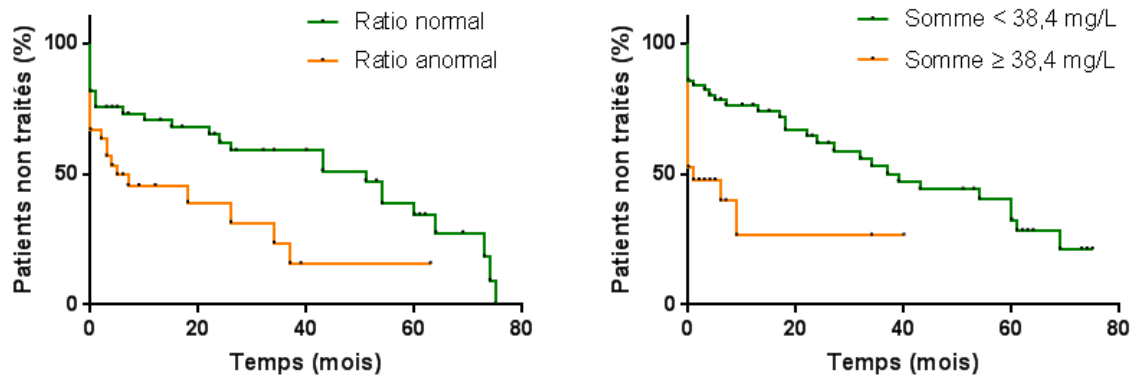

Figure 20 *- Temps de survie avant initiation d'une nouvelle ligne de traitement selon la présence d'anomalies du ratio κ/λ ou de la somme κ+λ*

2.3. Etude des variations de la maladie résiduelle et des dosages de chaines légères libres

En dépit de la sensibilité médiocre du dosage des chaines légères libres sériques pour détecter la positivité de la MRD, nous avons pu remarquer pour certains patients un « parallélisme » entre les variations des CLL et de la maladie résiduelle. L'exemple d'un patient est illustré dans les figures 21 et 22. Durant la période de suivi de ce malade, le ratio κ/λ et la somme κ+λ ont évolué au cours du temps de la même façon que le taux de cellules leucémiques résiduelles. Les flèches représentent sur ces graphiques les dates de mise sous traitement.

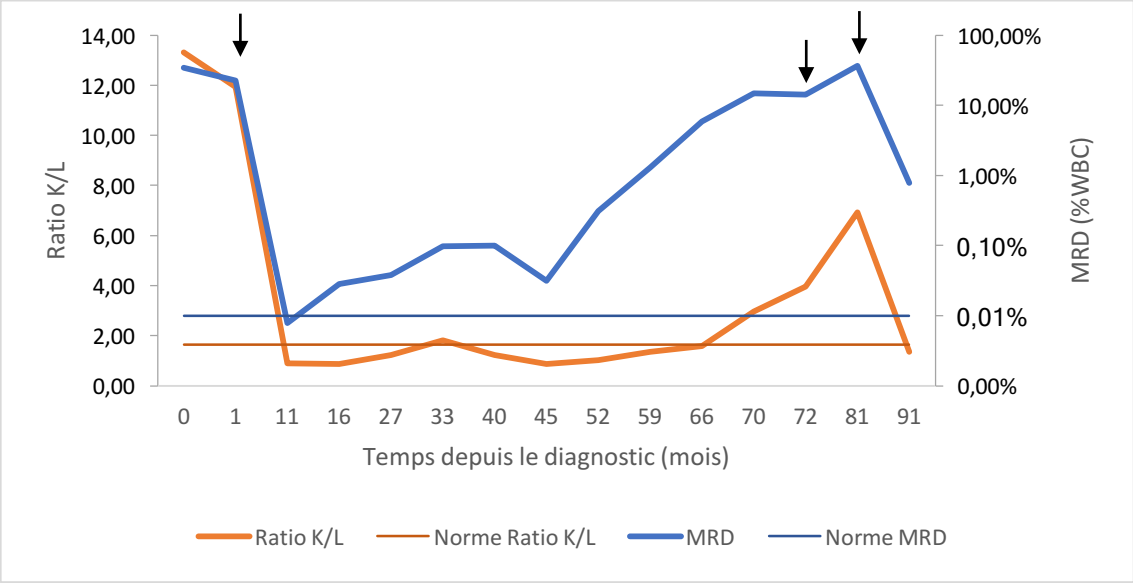

Figure 21 *- Evolution de la MRD et du ratio κ/λ au cours du temps, exemple d'un patient*

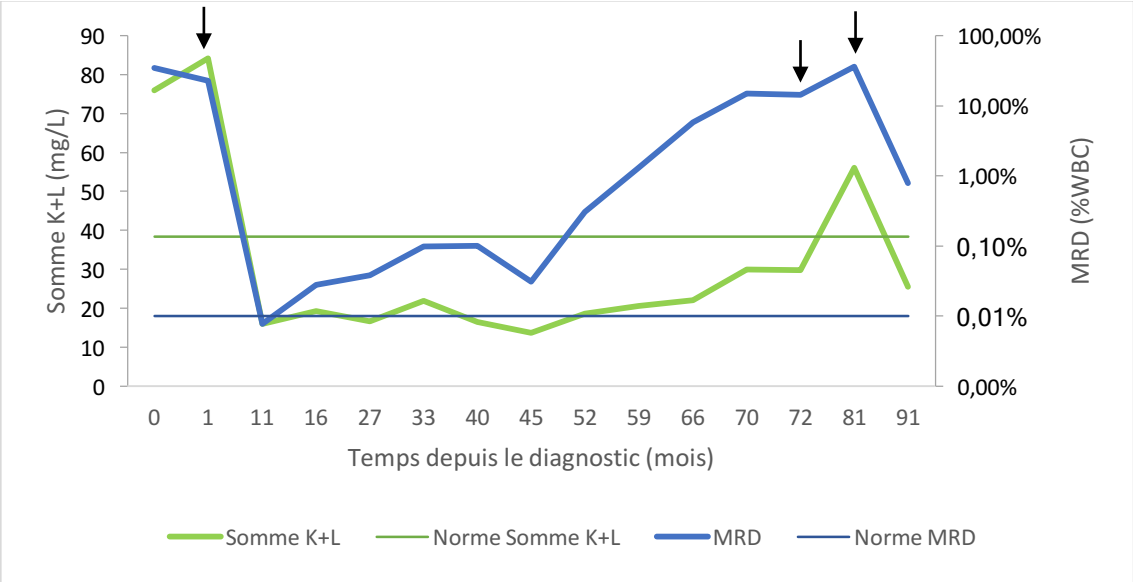

Figure 22 *- Evolution de la MRD et de la somme κ+λ au cours du temps, exemple d'un patient*

Au cours du suivi des patients, dans 64,1% des cas, les évolutions de la MRD et de la somme κ+λ étaient concordantes, c'est-à-dire qu'elles évoluaient de la même façon (Figure 23). Ce pourcentage est à pondérer par le fait que les variations très faibles ont été comptabilisées dans cette étude sans avoir réellement d'impact au niveau clinique. A titre d'exemple, une augmentation de 3,12% à 3,74% de la MRD avec un taux de κ+λ diminuant de 15,10 mg/L à 10,14 mg/L correspondaient à un cas de discordance, bien que les variations ne puissent pas être considérées comme significatives.

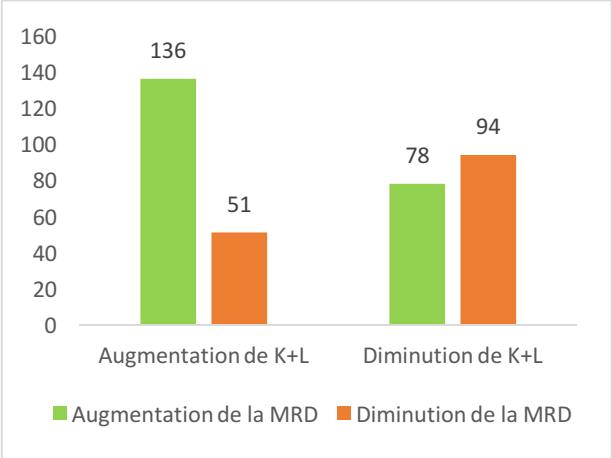

Figure 23 *- Concordance entre les variations de la MRD et celles de la somme κ+λ*

La figure 24 représente la variation de la somme κ+λ (en ordonnées) en fonction de la variation de la maladie résiduelle chez les patients atteints de LLC (en abscisses) aux différents points de suivi. Pour des soucis de lisibilité, plusieurs points extrêmes ont été supprimés du graphique mais confirment la tendance observée, à savoir qu'une variation importante de l'un ou l'autre des paramètres est associée à une variation de l'autre mesure dans le même sens dans la grande majorité des cas. Pour des variations de κ+λ supérieures à 20mg/L, une concordance dans le sens de la variation était observée dans 80% des cas.

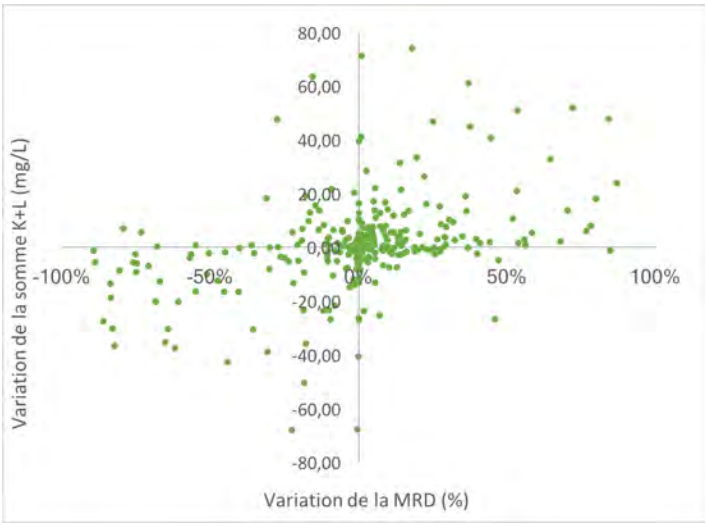

Figure 24 *- Variation de la somme κ+λ en fonction de la variation de la maladie résiduelle*

IV. Discussion

La LLC est une maladie dont l'évolution est très hétérogène, notamment au sein des patients en stade A, certains nécessitant un traitement rapidement après le diagnostic alors que d'autres restent de longues années sans évolution. Plusieurs études ont montré l'absence de bénéfice de l'introduction d'un traitement chez les patients en stade précoce de la maladie. Cependant, de part cette évolution très hétérogène, l'identification des patients à risque d'évolution rapide serait utile afin de cibler les malades chez qui un traitement précoce pourrait apporter un bénéfice.

De nombreux marqueurs pronostiques ont déjà été proposés pour la LLC mais posent, à l'exception de la β2-microglobuline et du stade de la maladie, le problème d'un accès très limité, cantonné aux centres spécialisés et aux patients pris en charge dans des études cliniques. Par exemple, l'étude du statut mutationnel *IGVH*, bien que semblant prédire de façon fiable l'évolution des patients, n'est pas réalisée en routine en raison de sa difficulté technique et d'un temps de réalisation long. Il en est de même pour la cytogénétique et les analyses de cytométrie en flux, qui nécessitent en outre une expertise importante. D'autres marqueurs, comme le CD23s, souffrent d'un manque important d'harmonisation important en termes d'interprétation. En effet, les études publiées à ce sujet proposent des seuils de significativité de 50 à plus de 2000 U/mL. Enfin, le coût entrant également en ligne de compte dans la prise en charge des patients, certains marqueurs ne peuvent être réalisés en routine.

Notre étude s'inscrit donc dans la démarche de recherche d'un marqueur pronostique « idéal », facilement réalisable, avec un coût faible et qui permettrait de classer les patients selon le risque d'évolution rapide et de nécessité de traitement. Nous avons souhaité, dans ce cadre, évaluer l'impact pronostique de différentes anomalies retrouvées lors du dosage des chaines légères libres sériques au moment de la prise en charge initiale de patients naïfs de traitement.

Notre étude a concerné 192 patients atteints de LLC non traités auparavant pris en charge à l'Institut Bergonié. L'âge médian de la population analysée était de 67 ans et le ratio homme/femme de 1,1. Des valeurs du même ordre de grandeur sont retrouvées dans les différentes études épidémiologiques, bien que le pourcentage de femme soit légèrement plus élevé dans notre cohorte (4).

La majorité des patients étaient diagnostiqués à un stade précoce de la maladie (78,1% en stade A de la classification de Binet). De même, la répartition des stades cliniques dans notre étude était concordante avec les études publiées (141). Environ 25% des patients diagnostiqués en stade A avaient été traités à la fin de l'étude, après une médiane de suivi de 30 mois. Pour la moitié de ces malades, l'initiation du traitement avait été effectuée au cours des 2 premières années de suivi. Ces données reflétaient bien l'hétérogénéité de l'évolution des patients diagnostiqués à un stade précoce de la maladie.

Environ 45% des patients de notre étude présentaient au diagnostic une anomalie des chaines légères libres quelle qu'elle soit. Ce pourcentage était concordant avec les données publiées dans les autres études dans lesquelles les anomalies étaient observées dans 33 à 55% des cas (141–145).
Une majorité d'entre eux (57,4%) présentaient une augmentation monoclonale (élévation de κ et/ou λ avec rapport anormal), 25,3% présentaient une augmentation polyclonale (élévation de κ et/ou λ avec rapport normal) et 17,2% présentaient une anomalie isolée du rapport κ/λ. Comme dans l'étude de Maurer *et al*., les différentes anomalies avaient toutes un impact pronostique sur la médiane de survie sans traitement. Cependant, le taux de traitement à la fin de l'étude n'était significativement augmenté que pour les patients avec une élévation monoclonale des chaines légères libres sériques (142). Par conséquent, l'augmentation polyclonale des chaines légères ou un déséquilibre du ratio sans augmentation des taux de CLL semblaient influer principalement sur la précocité du traitement.

Nous nous sommes focalisés par la suite sur l'impact des anomalies du ratio κ/λ sur la survie des patients sans traitement. Au sein de notre cohorte, 33,8% des patients présentaient une anomalie de ce rapport. L'anomalie retrouvée (augmentation ou diminution) était concordante avec la monotypie retrouvée à l'immunophénotypage sanguin dans 93,5% des cas. Parmi les 4 patients avec une discordance de ces données, un seul présentait un pic monoclonal IgG κ à l'électrophorèse des protéines sériques, expliquant l'augmentation du ratio. Aucune explication de la discordance n'a donc été trouvée pour les 3 autres patients. Maurer *et al*. retrouvaient dans leur étude un taux de concordance de 96% pour les patients avec une élévation monoclonale des CLL et de 92% pour ceux avec une anomalie du ratio isolée (142). Dans l'étude de Matschke *et al*., un taux de concordance de 91% était observé (145).

L'analyse de la valeur pronostique du ratio κ/λ a été étudiée dans un premier temps chez l'ensemble des patients puis seulement chez les patients en stade A de Binet.

Pour l'ensemble des patients, nous avons pu mettre en évidence un taux de traitement significativement plus élevé chez les patients avec un ratio κ/λ anormal. Cette anomalie était également associée à une médiane de survie sans traitement plus courte. Ces résultats étaient concordants avec la majorité des quelques études sur le sujet. Les études de Morabito *et al*. et Maurer *et al*. ont montré la valeur pronostique péjorative d'une anomalie du ratio sur la survie sans traitement chez un nombre important de patients au diagnostic (respectivement 449 et 339 patients dans les deux études) (142,144). Dans l'étude de Yegin *et al*., un ratio anormal était associé à un taux de patients traités plus élevé. Néanmoins, aucune différence significative n'avait été mise en évidence en termes de survie sans traitement. Cependant, seuls 30 patients présentaient un ratio anormal dans cette étude. Les résultats étaient donc obtenus sur un effectif faible de patients (143). Dans l'étude de Pratt *et al*., le temps avant mise sous traitement était significativement raccourci pour les patients avec un ratio anormal lorsque tous patients, traités ou non traités auparavant, étaient analysés. Chez les patients non traités auparavant, une tendance à la mise sous traitement plus rapide pouvait être observée mais la différence entre les groupes de patients n'était pas significative. Les auteurs évoquent cependant dans cette étude un nombre de patients et un temps de suivi insuffisants (141).

Chez les patients diagnostiqués en stade A, seule la médiane de survie sans traitement était significativement plus élevée pour les patients avec un ratio κ/λ normal. Les taux de traitement à la fin de l'étude pour les patients avec un ratio κ/λ normal et anormal n'étaient pas statistiquement différents mais semblaient confirmer la tendance observée chez l'ensemble des patients. Le ratio κ/λ semblait donc influer principalement sur la précocité du traitement chez les patients en stade A. Ce résultat nécessite cependant d'être confirmé compte tenu du temps de suivi relativement court de notre étude et par conséquent du faible nombre de patients en stade A traités à la fin de l'étude (33 patients sur 150). Dans l'étude de Maurer *et al*. un impact du ratio κ/λ sur la survie sans traitement chez les patients en stade A avait également été mis en évidence. Les taux de traitement n'avaient cependant pas été comparés dans cette étude (142).

Aucun impact du type d'anomalie du ratio n'a été mis en évidence sur la survie sans traitement. Cependant, seuls 7 patients présentaient une diminution du rapport, en faveur d'une surproduction de CLL λ. Ce résultat nécessite donc d'être confirmé dans une étude plus large.

L'intérêt pronostique de la somme des chaines légères libres κ et λ a été montré en 2011 par Morabito *et al*.. Au-delà d'un seuil établi à 60,6 mg/L, ce marqueur était associé à un mauvais pronostic et corrélé à d'autres facteurs pronostiques défavorables. Nous avons souhaité, dans la continuité de cette

publication, évaluer l'intérêt pronostique de cette nouvelle variable. Le cut-off de la somme κ+λ permettant de différencier avec le meilleur rapport sensibilité/spécificité les patients traités des patients naïfs de traitement était de 38,4 mg/L. Ce seuil était donc plus faible que le cut-off choisi par l'équipe de Morabito *et al*.. Cependant, aucune précision sur les critères de choix de ce seuil n'a été fourni par ces derniers : sensibilité ou spécificité élevée ? Meilleur rapport sensibilité/spécificité ? (144) Dans notre étude, ce seuil de 38,4 mg/L permettait néanmoins de confirmer les résultats précédemment décrits, à savoir une survie sans traitement plus courte pour une somme κ+λ augmentée, quel que soit le stade de la maladie. Le taux de traitement était également plus élevé en fin d'étude dans le groupe de patients avec κ+λ supérieur à 38,4 mg/L que dans le groupe avec une somme inférieure au seuil.

Comme dans l'étude de Morabito *et al*., la présence d'une anomalie de la somme κ+λ semblait être de moins bon pronostic que la présence d'une anomalie du rapport κ/λ.

Les patients avec une somme κ+λ augmentée étaient à 70% des patients avec une élévation monoclonale des chaines légères libres sériques. Pour ces patients, un déséquilibre du ratio κ/λ traduit l'accumulation dans le sérum d'un type de chaine légère libre résultant probablement de l'accumulation d'un clone de lymphocytes B. Nous pouvons penser dans ce cas que la présence d'un ratio anormal est le reflet d'une maladie agressive. Environ 30% des patients avec une somme κ+λ élevée présentaient une élévation polyclonale des chaines légères libres. Une étude a montré dans la population générale qu'une élévation polyclonale des CLL sériques pourrait prédire la mortalité chez les individus de plus de 50 ans (146). La présence d'une élévation polyclonale peut donc être interprétée comme un marqueur de « mauvaise forme », reflétant une stimulation immune généralisée chez les patients âgés. Cependant, bien que le « fitness » des patients puisse certainement affecter la survie globale des patients, son influence sur le temps avant la mise sous traitement, principalement lié à l'agressivité de la maladie, est plus difficile à démontrer. De plus, l'association d'une somme κ+λ élevée avec la présence de nombreux marqueurs pronostiques intrinsèques à la maladie comme l'expression de ZAP-70 et la présence d'anomalies cytogénétiques plaide en faveur d'un lien avec la physiopathologie de la LLC. Une des hypothèses serait que la surproduction polyclonale des chaines légères libres sériques pourrait elle-même jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie, notamment sur le microenvironnement tumoral. A titre d'exemple, il a été montré que les chaines légères libres pouvaient activer les mastocytes, eux-mêmes capables à leur tour de soutenir la croissance des cellules tumorales (147,148).

Concernant les autres marqueurs pronostiques déjà décrits dans la LLC, seule l'expression du CD38 n'était pas associée à un taux de traitement plus élevé et à une survie sans traitement plus courte au sein de notre cohorte. Ce résultat était discordant avec la majorité de nombreuses études publiées sur le sujet (90–92). Cependant, les seuils d'interprétation de l'expression du CD38 étant très variables selon les études, des analyses en considérant un seuil plus bas d'expression de CD38 pourraient être utiles pour confirmer les résultats obtenus.
La TK sérique permettait d'évaluer le risque de traitement pour l'ensemble des patients mais les différences en termes de survie sans traitement et de taux de traitement n'étaient pas significatives lorsque seuls les patients en stade A étaient considérés. Ces résultats vont à l'encontre de ceux trouvés par l'équipe de Hallek *et al*. (107). Cependant, seuls 42 patients en stade A avaient bénéficié d'un dosage de la TK sérique dans notre étude. Ces résultats sont donc difficilement interprétables et sont à confirmer sur un nombre plus important de patients.

Le déséquilibre du ratio κ/λ était associé à la présence d'autres facteurs de mauvais pronostic (stade B ou C de Binet, taux augmentés de β2-microglobuline et de CD23s). La corrélation avec les marqueurs cytogénétiques de mauvais pronostic n'était cependant pas franche : absence d'association avec la présence d'une del(17p) ou d'une del(11q) mais présence d'une association significative entre un ratio anormal et la présence d'une trisomie 12. Aucune association significative n'était notée pour les autres facteurs pronostiques étudiés, à savoir la positivité de ZAP-70, l'expression de CD38, l'élévation des taux de sTK. Dans l'étude de Morabito *et al*., la présence d'un ratio anormal était associée à une expression de CD38 et de ZAP-70, à un statut non muté des gènes *IGVH* et au stade de la maladie. Cependant, de la même façon que dans notre cohorte, la présence d'un ratio κ/λ anormal n'était pas associée à la présence d'une cytogénétique défavorable (144). Pratt *et al*. ont mis en évidence une association entre un ratio anormal et la présence d'une positivité de ZAP-70, d'un statut non muté des gènes *IGVH*, d'un TDL inférieur à 12 mois et de taux élevés de β2-microglobuline (141).

Comme pour le ratio κ/λ anormal, une association significative pouvait être notée entre l'anomalie de la somme κ+λ, un stade avancé selon la classification de Binet et des taux de β2-microglobuline et de CD23s augmentés. De plus, à la différence du ratio κ/λ, une association significative était également observée avec la présence d'une cytogénétique défavorable (del(17p) ou del(11q)) ou intermédiaire (trisomie 12), d'un taux élevé de sTK et d'une expression de ZAP-70. Ces résultats sont concordants avec ceux de Morabito *et al*., qui retrouvent également une association de ce paramètre avec l'expression de ZAP-70, le stade selon la classification de Binet et la cytogénétique (144).

En analyse multivariée, seuls une augmentation de la somme κ+λ, l'expression de ZAP-70 et un taux élevé de CD23s étaient indépendamment associés au risque de mise sous traitement, après ajustement selon les données des taux de β2-microglobuline, sTK, ratio κ/λ, selon l'âge et selon les résultats de cytogénétique. Chez les patients en stade A, seule l'expression de ZAP-70 était indépendamment associée à un risque de mise sous traitement. Cependant, l'ensemble des dosages des paramètres étudiés n'était disponible que chez 36 patients de notre étude dont 26 en stade A. Ce nombre très faible ne nous permet pas d'interpréter correctement les résultats de l'analyse multivariée obtenus.

Au total, à la lumière de la publication de Morabito *et al*., de notre étude, et des tendances observées dans les autres études évoquées, nous pensons que le dosage des chaines légères libres κ et λ, et notamment l'évaluation du ratio κ/λ et de la somme κ+λ, peuvent présenter un intérêt pronostique majeur dans la leucémie lymphoïde chronique. Ce marqueur revêt l'avantage d'un dosage simple, automatisable, adaptable dans de nombreux laboratoires sur les automates de biochimie, avec un coût faible (40,50 euros, nomenclature RIHN). Son utilisation au moment de la prise en charge initiale des patients atteints de LLC permettrait de prédire de façon fiable le risque d'évolution vers une mise sous traitement, en particulier chez les patients en stade A pour qui ce risque est très variable d'un individu à l'autre.

Un score, calculé uniquement à partir de marqueurs faciles à obtenir, à savoir la β2-microglobuline, le stade et la somme κ+λ permettait, de façon simple et peu coûteuse, de classer les patients en 3 catégories selon leur risque de mise en place rapide d'un traitement : risque faible, intermédiaire ou haut risque.
Pour ce score, malgré son excellente valeur pronostique, nous avons choisi de ne pas utiliser le marqueur CD23s. En effet, selon les études, le cut-off permettant de différencier les patients à risque ou non de traitement semble très variable : de 50 U/mL à plus de 2000 U/mL. Une standardisation de ces limites semble donc être un préalable important à l'utilisation de ce marqueur en pratique chez les patients atteints de LLC.

De la même façon, dans notre étude, le cut-off de la somme κ+λ permettant de classer au mieux les patients traités et ceux non traités était de 38,4 mg/L tandis qu'il était de 60,6 mg/L dans l'étude de Morabito *et al*. Il serait donc nécessaire de confirmer ces résultats, dans une étude à plus grande échelle, afin de standardiser les résultats obtenus. Le temps de suivi des patients au diagnostic étant limité dans notre étude, ceci permettrait également de confirmer les résultats à plus long terme.

Nous nous sommes intéressés dans la seconde partie de ce travail à l'intérêt potentiel du dosage des chaines légères libres sériques dans le suivi de la maladie. En particulier, nous avons souhaité apprécier la relation entre chaines légères libres sériques et maladie résiduelle. A notre connaissance, aucune étude n'a à ce tour tenté d'explorer ce lien.

Le dosage de la MRD permet, au cours du suivi de la maladie, d'évaluer la quantité de cellules leucémiques résiduelles dans le sang des patients. Ce paramètre varie par conséquent dans le temps, au gré des traitements et évolutions de la maladie. La mesure de la maladie résiduelle a montré son intérêt dans l'évaluation de la réponse aux traitements de la LLC. En effet, lorsqu'une rémission clinique est obtenue après un traitement, mais que la MRD est positive, l'effet du traitement n'est pas considéré comme étant optimal. Plusieurs études ont montré l'impact négatif de la présence de cellules leucémiques résiduelles dans le suivi post-traitement, associée à un temps sans progression plus court. L'utilisation de la MRD pour l'évaluation de la profondeur de la réponse au traitement n'est cependant recommandée que pour les patients inclus dans des études cliniques.

En considérant l'hypothèse selon laquelle le taux de chaines légères libres est le reflet du clone tumoral, nous avons souhaité explorer un potentiel lien entre les dosages de chaines légères libres sériques et le taux de la maladie résiduelle dans le sang. Une anomalie du ratio κ/λ permettait de prédire une maladie résiduelle positive (> 0,01%) avec une valeur prédictive positive de 93,1%. En d'autres termes, 93,1% des patients avec un ratio κ/λ anormal avaient une maladie résiduelle positive, et étaient donc potentiellement à risque d'une rechute plus précoce. Cependant, la sensibilité de ce marqueur pour évaluer la maladie résiduelle était faible, de l'ordre de 37%. Un ratio κ/λ normal n'était donc pas prédictif d'une maladie résiduelle négative. Les résultats obtenus avec la somme $\kappa + \lambda$ étaient similaires, avec une VPP légèrement moins élevée, évaluée à 92%.
Dans les suites immédiates des traitements (0 à 6 mois plus tard), un ratio anormal et une somme $\kappa+\lambda$ augmentée permettaient de prédire la présence d'une MRD supérieure à 0,01% avec des VPP de 82,8% et 90,5% respectivement. L'utilisation d'un seuil de MRD à 1% permettait d'augmenter la sensibilité et la VPN : un ratio normal et une somme inférieure à 38,4 mg/L étaient respectivement associés dans 83% et 93,6% des cas à une MRD inférieure à 1%.
De façon similaire à ce qui a pu être observé pour la MRD, le temps médian de survie avant le traitement suivant était significativement plus court pour les patients avec un ratio κ/λ anormal ou une somme $\kappa+\lambda$ anormale.

Plus globalement, au cours du suivi de la maladie, l'étude des variations de la MRD a permis de mettre en évidence un certain « parallélisme » avec le ratio κ/λ et le taux de κ+λ. Les marqueurs évoluaient dans le même sens dans la majorité des cas. Cette relation n'est pas absolue mais pourrait être exploitée comme une information intéressante dans la prise en charge des patients, avec un coût analytique faible (le coût de réalisation du dosage des chaines légères libres étant de 40,5 euros contre 135 pour la MRD) et une réalisation possible dans des laboratoires non spécialisés.

Cependant, notre étude concernant le parallélisme entre les chaines légères libres sériques et la MRD se heurte à quelques limites. En particulier, nous soulevons le problème d'un manque de standardisation des délais de réalisation de la maladie résiduelle après traitement. Une étude prospective, à plus grande échelle, avec des temps de suivi standardisés, serait nécessaire pour confirmer l'intérêt du dosage des CLL dans le suivi de la maladie. En outre, l'intégration de données de MRD dans la moelle osseuse, plus informative que la MRD sanguine, pourrait apporter des informations complémentaires sur l'apport du dosage des chaines légères libres dans le suivi des patients, en améliorant probablement la spécificité et la valeur prédictive positive des anomalies de dosage des CLL.

Conclusion

Nous confirmons dans cette étude l'intérêt du dosage des chaines légères libres sériques dans la leucémie lymphoïde chronique, au moment de la prise en charge initiale en tant que marqueur de mauvais pronostic. Chez les patients non traités auparavant, la présence d'une anomalie du ratio κ/λ ou, de façon plus significative encore, d'une augmentation de la somme κ+λ était associée à une médiane de survie sans traitement plus courte. Ces anomalies de dosage des chaines légères libres sériques étaient également associées à la présence d'autres facteurs de mauvais pronostic tels qu'un stade avancé de la maladie, des taux de β2-microglobuline et de CD23 soluble augmentés, des anomalies cytogénétiques défavorables et une expression de ZAP-70. Le dosage des chaines légères libres sériques présente l'avantage d'un faible coût, d'une technique automatisable et facile à mettre en place sur la plupart des automates de biochimie et d'une disponibilité immédiate du résultat. Ces paramètres pourraient par conséquent être utilisés en routine dans les laboratoires sans difficulté, afin d'identifier les patients à risque d'évolution rapide.

De plus, nous avons pu également mettre en évidence dans cette étude l'intérêt du dosage des chaines légères libres sériques dans le suivi de la maladie. Après traitement, la présence d'une anomalie du ratio κ/λ était associée à la présence d'une MRD positive avec une bonne valeur prédictive positive. La présence d'une anomalie de dosage des chaines légères libres sériques était associée à un délai raccourci avant introduction d'une nouvelle ligne de traitement. De plus, un certain « parallélisme » entre l'évolution de la maladie résiduelle au niveau sanguin et celle des anomalies de dosage des chaines légères libres a pu être observée. Bien que le dosage des chaines légères libres ne puisse pas prédire de façon absolue la positivité de la MRD, ces observations pourraient être des informations utiles dans la prise en charge des patients, à l'heure où de nombreuses études s'intéressent à l'adaptation des traitements selon les résultats de MRD. De nouvelles études prospectives et standardisées sont cependant nécessaires pour confirmer ces observations.

Bibliographie

1. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2008 Aug 7;359(6):575–83.

2. Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia–like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. Blood. 2009 Jul 2;114(1):33–7.

3. Dagklis A, Fazi C, Sala C, Cantarelli V, Scielzo C, Massacane R, et al. The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)–like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. Blood. 2009 Jul 2;114(1):26–32.

4. Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 - Partie 2: Hémopathies malignes. INVS. 2013;

5. Goldin LR, Caporaso NE. Family studies in chronic lymphocytic leukaemia and other lymphoproliferative tumours. Br J Haematol. 2007 Dec 1;139(5):774–9.

6. 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 Jun 1;109(4):794–9.

7. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. J Exp Med. 2001 Dec 3;194(11):1625–38.

8. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med. 2001 Dec 3;194(11):1639–48.

9. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-κB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011 Jan 13;117(2):563–74.

10. Minden MD, Übelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. Nature. 2012 Sep 13;489(7415):309–12.

11. Awan FT, Byrd JC. New strategies in chronic lymphocytic leukemia: shifting treatment paradigms. Clin Cancer Res. 2014 Dec 1;20(23):5869–74.

12. Yarkoni Y, Getahun A, Cambier JC. Molecular underpinning of B-cell anergy. Immunol Rev. 2010 Sep 1;237(1):249–63.

13. Getahun A, Beavers NA, Larson SR, Shlomchik MJ, Cambier JC. Continuous inhibitory signaling by both SHP-1 and SHIP-1 pathways is required to maintain unresponsiveness of anergic B cells. J Exp Med. 2016 May 2;213(5):751–69.

14. Packham G, Krysov S, Allen A, Savelyeva N, Steele AJ, Forconi F, et al. The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. Haematologica. 2014 Jul 1;99(7):1138–48.

15. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci. 2002 Nov 26;99(24):15524–9.

16. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2005 Oct 27;353(17):1793–801.

17. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 27;102(39):13944–9.

18. Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, Spizzo R, Nicoloso MS, Rossi S, et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. JAMA. 2011 Jan 5;305(1):59–67.

19. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. Cancer Cell. 2010 Jan 19;17(1):28–40.

20. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. Nat Rev Cancer. 2010 Jan;10(1):37–50.

21. Endo T, Nishio M, Enzler T, Cottam HB, Fukuda T, James DF, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-κB pathway. Blood. 2007 Jan 15;109(2):703–10.

22. HAS. Guide HAS - Leucémie lymphoïde chronique. 2011 Juin

23. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Geyer SM, LaPlant BR, Call TG, et al. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. Mayo Clin Proc. 2007 Apr;82(4):449–53.

24. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Bone ND, et al. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2009 Apr 10;27(11):1844–9.

25. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia. 1994 Oct;8(10):1640–5.

26. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). Am J Clin Pathol. 1997 Oct;108(4):378–82.

27. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. Blood. 2008 Jun 15;111(12):5446–56.

28. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. Am J Hematol. 2015 mai;90(5):446–60.

29. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2015

Sep 1;26(S5):78–84.

30. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1975 Aug 1;46(2):219–34.

31. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer. 1981 Jul 1;48(1):198–206.

32. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 1998 May 21;338(21):1506–14.

33. Shustik C, Mick R, Silver R, Sawitsky A, Rai K, Shapiro L. Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: Intermittent chlorambucil versus observation. Hematol Oncol. 1988 Jan 1;6(1):7–12.

34. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia—what do we need to know? Nat Rev Clin Oncol. 2011 Jan;8(1):38–47.

35. Nguyen-Khac F. Les anomalies cytogénétiques dans la leucémie lymphoïde chronique. Ann Biol Clin (Paris). 2010 May 1;68(3):273–6.

36. Leroux D, Lefebvre C, Callanan M. Anomalies génétiques des leucémies lymphoides chroniques. Pathol Biol. 2003 Aug 1;51(6):366–74.

37. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000 Dec 28;343(26):1910–6.

38. Smonskey MT, Block AW, Deeb G, Chanan-Khan AA, Bernstein ZP, Miller KC, et al. Monoallelic and biallelic deletions of 13q14.3 in chronic lymphocytic leukemia: FISH vs miRNA RT-qPCR detection. Am J Clin Pathol. 2012 Apr 1;137(4):641–6.

39. Garg R, Wierda W, Ferrajoli A, Abruzzo L, Pierce S, Lerner S, et al. The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. Cancer. 2012 Jul 15;118(14):3531–7.

40. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, Manohar V, Abbasi F, Lin Y-C, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. Blood. 2007 Jun 15;109(12):5079–86.

41. Winkler D, Schneider C, Kröber A, Pasqualucci L, Lichter P, Döhner H, et al. Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Leukemia. 2005 Jul;19(7):1211–5.

42. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2006 Jan 15;107(2):742–51.

43. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403–12.

44. Oscier DG, Stevens J, Hamblin TJ, Pickering RM, Lambert R, Fitchett M. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 1990 Nov 1;76(3):352–8.

45. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. Br J Haematol. 1996 Jan 1;92(2):382–8.

46. Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, et al. Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. The Lancet. 1999 Jan 2;353(9146):26–9.

47. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Schröder M, Schlegelberger B, Fischer K, et al. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. Proc Natl Acad Sci. 1996 Oct 15;93(21):11837–41.

48. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Döhner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999 Jul 15;94(2):748–53.

49. Kalla C, Scheuermann MO, Kube I, Schlotter M, Mertens D, Döhner H, et al. Analysis of 11q22–q23 deletion target genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: Evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B. Eur J Cancer. 2007 May 1;43(8):1328–35.

50. Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ, Neuberg D, Ghia E, Heerema NA, et al. The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. Br J Haematol. 2016 Apr 1;173(1):105–13.

51. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H, German CLL Study Group (GCLLSG). Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. Leukemia. 2002 Jun;16(6):993–1007.

52. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do K-A, et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2011 Nov 1;29(31):4088–95.

53. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. Blood. 2002 Aug 15;100(4):1177–84.

54. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. Blood. 2008 Oct 15;112(8):3322–9.

55. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. The Lancet. 2010 Oct 2;376(9747):1164–74.

56. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, 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. 2007 Mar 1;25(7):799–804.

57. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Dyke DLV, O'Brien S, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. Blood. 2009 Jul 30;114(5):957–64.

58. Fischer K, Cramer P, Busch R, Stilgenbauer S, Bahlo J, Schweighofer CD, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a

multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. J Clin Oncol. 2011 Sep 10;29(26):3559–66.

59. Doubek M, Mayer J, Obrtlíková P, Smolej L, Cmunt E, Schwarz J, et al. Modern and conventional prognostic markers of chronic lymphocytic leukaemia in the everyday haematological practice. Eur J Haematol. 2011 Aug 1;87(2):130–7.

60. Bulian P, Rossi D, Forconi F, Del Poeta G, Bertoni F, Zucca E, et al. IGHV gene mutational status and 17p deletion are independent molecular predictors in a comprehensive clinical-biological prognostic model for overall survival prediction in chronic lymphocytic leukemia. J Transl Med. 2012 Jan 30;10:18.

61. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. Blood. 2004 May 1;103(9):3278–81.

62. Yu L, Kim HT, Kasar S, Benien P, Du W, Hoang K, et al. Survival of del(17p) CLL depends on genomic complexity and somatic mutation. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2017 Feb 1;23(3):735–45.

63. Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Döhner K, et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 1999 Sep;13(9):1331–4.

64. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, et al. Prognostic subgroups in B-Cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. N Engl J Med. 1990 Sep 13;323(11):720–4.

65. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: Development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 27;101(4):1039–44.

66. Sellmann L, Gesk S, Walter C, Ritgen M, Harder L, Martín-Subero JI, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2007 Jul 1;138(2):217–20.

67. Coll-Mulet L, Gil J. Genetic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Clin Transl Oncol. 2009 Apr;11(4):194–8.

68. Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D, et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. Leuk Res. 2010 Jan 1;34(1):63–8.

69. Brown JR, Hanna M, Tesar B, Werner L, Pochet N, Asara JM, et al. Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. Clin Cancer Res. 2012 Jul 15;18(14):3791–802.

70. Mian M, Rinaldi A, Mensah AA, Rossi D, Ladetto M, Forconi F, et al. Large genomic aberrations detected by SNP array are independent prognosticators of a shorter time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia patients with normal FISH. Ann Oncol. 2013 May 1;24(5):1378–84.

71. Rinaldi A, Mian M, Kwee I, Rossi D, Deambrogi C, Mensah AA, et al. Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2011 Sep 1;154(5):590–

9.

72. Rodríguez AE, Robledo C, García JL, González M, Gutiérrez NC, Hernández JA, et al. Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. Ann Oncol. 2012 Aug 1;23(8):2138–46.

73. Willis TG, Dyer MJS. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. Blood. 2000 Aug 1;96(3):808–22.

74. Michaux L, Wlodarska I, Rack K, Stul M, Criel A, Maerevoet M, et al. Translocation t(1;6)(p35.3;p25.2): a new recurrent aberration in "unmutated" B-CLL. Leukemia. 2004 Oct 28;19(1):77–82.

75. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgV_H status, and CD38 expression. Blood. 2006 Nov 1;108(9):3152–60.

76. Amaya-Chanaga CI, Rassenti LZ. Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. Best Pract Res Clin Haematol. 2016 Mar 1;29(1):79–89.

77. Gentile M, Cutrona G, Neri A, Molica S, Ferrarini M, Morabito F. Predictive value of β2-microglobulin (β2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. Haematologica. 2009 Jun 1;94(6):887–8.

78. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002 Aug 15;100(4):1410–6.

79. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. Haematologica. 2007 Sep 1;92(9):1242–5.

80. Hayat A, O'Brien D, O'Rourke P, McGuckin S, Fitzgerald T, Conneally E, et al. CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2006 Jan 1;47(11):2371–9.

81. Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, Bone ND, Dewald GW, Hanson CA, et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2001 Dec 1;115(4):854–61.

82. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. Blood. 2002 Feb 1;99(3):1023–9.

83. 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 Sep 15;94(6):1848–54.

84. Tobin G, Thunberg U, Laurell A, Karlsson K, Aleskog A, Willander K, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia with mutated VH genes presenting with Binet stage B or C form a subgroup with a poor outcome. Haematologica. 2005 Apr;90(4):465–9.

85. Schroers R, Griesinger F, Trümper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L, et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2005 Mar 10;19(5):750–8.

86. Heintel D, Schwarzinger I, Chizzali-Bonfadin C, Thalhammer R, Schwarzmeier J, Fritzer-Szekeres M, et al. Association of CD38 antigen expression with other prognostic parameters in early stages of chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2001 Jan 1;42(6):1315–21.

87. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, 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 Apr 1;121(2):287–95.

88. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, Mahé B, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2002 Jan 1;116(1):142–50.

89. Domingo-Domenech E, Domingo-Claros A, Gonzalez-Barca E, Beneitez D, Alonso E, Romagosa V, et al. CD38 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. Haematologica. 2002 Jan 1;87(10):1021–7.

90. Dürig J, Naschar M, Schmücker U, Renzing-Köhler K, Hölter T, Hüttmann A, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia. 2002 Jan;16(1):30–5.

91. Poeta GD, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2001 Nov 1;98(9):2633–9.

92. Ibrahim S, Keating M, Do K-A, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2001 Jul 1;98(1):181–6.

93. Morabito F, Mangiola M, Oliva B, Stelitano C, Callea V, Deaglio S, et al. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res. 2001 Nov 1;25(11):927–32.

94. D'arena G, Musto P, Cascavilla N, Dell'olio M, Renzo N di, Perla G, et al. CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-Cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2001 Jan 1;42(1–2):109–14.

95. Ghia P, Scielzo C, Frenquelli M, Muzio M, Caligaris-Cappio F. From normal to clonal B cells: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2007 décembre;7(2):127–31.

96. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2008 Sep 1;112(5):1923–30.

97. Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. Blood. 2003 Feb 15;101(4):1262–9.

98. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. The Lancet. 2004 Jan 10;363(9403):105–11.

99. Dürig J, Nückel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2003 Oct 2;17(12):2426–34.

100. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region mutations in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2003 May 1;348(18):1764–75.

101. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with Immunoglobulin Heavy-Chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2004 Aug 26;351(9):893–901.

102. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. Blood. 2003 Jun 15;101(12):4944–51.

103. Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seiler T, Kienle D, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2006 Feb 20;24(6):969–75.

104. Letestu R, Rawstron A, Ghia P, Villamor N, Boeckx N, Leuven NB, et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: A multicentric international harmonization process. Cytometry B Clin Cytom. 2006 Jul 15;70(4):309–14.

105. Le Garff-Tavernier M, Ticchioni M, Brissard M, Salmon C, Raynaud S, Davi F, et al. National standardization of ZAP-70 determination by flow cytometry: the French experience. Cytometry B Clin Cytom. 2007 Mar;72(2):103–8.

106. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do K-A, et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. J Clin Oncol. 2009 Apr 1;27(10):1637–43.

107. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999 Mar 1;93(5):1732–7.

108. Matthews C, Catherwood MA, Morris TCM, Kettle PJ, Drake MB, Gilmore WS, et al. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. Eur J Haematol. 2006 Oct 1;77(4):309–17.

109. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1996 Dec 1;88(11):4259–64.

110. Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and β2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Eur J Haematol. 1999 Feb 1;62(2):117–22.

111. Knauf WU, Langenmayer I, Ehlers B, Mohr B, Adorf D, Nerl CH, et al. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 1997 Jan 1;27(5–6):523–32.

112. Callea V, Morabito F, Luise F, Piromalli A, Filangeri M, Stelitano C, et al. Clinical significance of sIL2R, sCD23, sICAM-1, IL6 and sCD 14 serum levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Haematologica. 1996 Jan 1;81(4):310–5.

113. Leotard S, Chastang C, Travade P, Jaudon MC, Tournilhac O, Baudet S, et al. Prognostic relevance of a scoring system based on clinical and biological parameters in early chronic lymphocytic leukemia. Hematol J. 2000;1(5):301–6.

114. Saka B, Aktan M, Sami U, Oner D, Sanem O, Dinçol G. Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Clin Lab Haematol. 2006 Feb 1;28(1):30–5.

115. Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Marschitz I, Louda N, Hubmann R, et al. The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2002 Jan 1;43(3):549–54.

116. Reinisch W, Willheim M, Hilgarth M, Gasché C, Mader R, Szepfalusi S, et al. Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 1994 Oct 1;12(10):2146–52.

117. Meuleman N, Stamatopoulos B, Dejeneffe M, El Housni H, Lagneaux L, Bron D. Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients. Leukemia. 2008 Jul 17;22(10):1882–90.

118. Bergmann MA, Eichhorst BF, Busch R, Adorf D, Stilgenbauer S, Eckart MJ, 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 Nov 16;110(11):625–625.

119. 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 Mar 1;62(3):567–75.

120. Viñolas N, Reverter J, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance. Blood Cells. 1987;12(2):457–70.

121. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. Cancer. 1987 Dec 1;60(11):2712–6.

122. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. Lancet Oncol. 2016 Jun 1;17(6):779–90.

123. Thompson PA, Wierda WG. Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL. Blood. 2016 Jan 21;127(3):279–86.

124. Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, González-Barca E, González M, Ferrà C, et al. Rituximab maintenance after first-line therapy with rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) for chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2013 Dec 5;122(24):3951–9.

125. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia. 2007 Mar 15;21(5):956–64.

126. Owen C, Christofides A, Johnson N, Lawrence T, MacDonald D, Ward C. Use of minimal residual disease assessment in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2017 May 16;0(0):1–9.

127. Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, Evans PAS, O'Connor SJM, Doughty C, et al. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. Blood. 2016 Dec 15;128(24):2770–3.

128. Kovacs G. Value of minimal residual disease-negative status at response evaluation in CLL: combined analysis of two phase III studies of the German CLL Study Group | New Evidence [Internet]. ASH. [cited 2017 Aug 28]. Available from: http://www.newevidence.com/oncology/value-of-minimal-residual-disease-negative-status-at-response-evaluation-in-cll-combined-analysis-of-two-phase-iii-studies-of-the-german-cll-study-group/

129. Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, Bahlo J, Cramer P, von Tresckow J, et al. Minimal Residual Disease assessment improves prediction of outcome in patients With chronic lymphocytic leukemia (CLL) who achieve partial response: Comprehensive analysis of two phase III studies of the German CLL Study Group. J Clin Oncol. 2016 Oct 23;34(31):3758–65.

130. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. J Clin Oncol. 2012 Mar 20;30(9):980–8.

131. Thompson PA, Strati P, Keating M, O'Brien SM. Early achievement of MRD-negativity in IGHV-mutated patients portends highly favorable outcomes after first-line treatment of CLL with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR). Serial monitoring for Minimal Residual Disease (MRD) in blood after achieving MRD-Negativity predicts subsequent clinical relapse. Blood. 2016;128–232.

132. Varghese AM, Howard DR, Pocock C, Rawstron AC, Follows G, McCarthy H, et al. Eradication of minimal residual disease improves overall and progression-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia, evidence from NCRN CLL207: a phase II trial assessing alemtuzumab consolidation. Br J Haematol. 2017 Feb 1;176(4):573–82.

133. Solomon A. Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins (first of two parts). N Engl J Med. 1976 Jan 1;294(1):17–23.

134. Solomon A. Light chains of human immunoglobulins. Methods Enzymol. 1985;116:101–21.

135. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. Current concepts in proteinuria. Clin Chem. 1989 May 1;35(5):755–65.

136. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin Chem. 2002 Sep 1;48(9):1437–44.

137. Gordon J, Howlett AR, Smith JL. Free light chain synthesis by neoplastic cells in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma. Immunology. 1978 Mar;34(3):397–404.

138. Nowrousian MR, Brandhorst D, Sammet C, Kellert M, Daniels R, Schuett P, et al. Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. Clin Cancer Res. 2005 Dec 15;11(24):8706–14.

139. Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. Blood.

2001 May 1;97(9):2900–2.

140. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol. 2006 Sep;134(6):573–89.

141. Pratt G, Harding S, Holder R, Fegan C, Pepper C, Oscier D, et al. Abnormal serum free light chain ratios are associated with poor survival and may reflect biological subgroups in patients with chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2009 Jan 1;144(2):217–22.

142. Maurer MJ, Cerhan JR, Katzmann JA, Link BK, Allmer C, Zent CS, et al. Monoclonal and polyclonal serum free light chains and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011 Sep 8;118(10):2821–6.

143. Yegin ZA, Özkurt ZN, Yağcı M. Free light chain: a novel predictor of adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Haematol. 2010 May 1;84(5):406–11.

144. Morabito F, De Filippi R, Laurenti L, Zirlik K, Recchia AG, Gentile M, et al. The cumulative amount of serum-free light chain is a strong prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011 Dec 8;118(24):6353–61.

145. Matschke J, Eisele L, Sellmann L, Duehrsen U, Duerig J, Nückel H. Abnormal free light chain ratios in chronic lymphocytic leukemia: a new prognostic factor? Blood. 2009 Nov 20;114(22):1237–1237.

146. Dispenzieri A, Kyle R, Katzmann JA, Larson D, Kumar S, Mead GP, et al. Non-clonal serum immunoglobulin free light chains (FLC) as markers of overall survival. Blood. 2010 Nov 19;116(21):3893–3893.

147. Rijnierse A, Redegeld FA, Blokhuis BR, Van der Heijden MW, Te Velde AA, Pronk I, et al. Ig-free light chains play a crucial role in murine mast cell-dependent colitis and are associated with human inflammatory bowel diseases. J Immunol. 2010 Jul 1;185(1):653–9.

148. Tripodo C, Sangaletti S, Piccaluga PP, Prakash S, Franco G, Borrello I, et al. The bone marrow stroma in hematological neoplasms--a guilty bystander. Nat Rev Clin Oncol. 2011 Mar 29;8(8):456–66.

Abstract:

Study of serum free light chain assay utility in chronic lymphocytic leukemia

Background: Chronic lymphocytic leukemia is characterized by a highly variable clinical course, especially in patients diagnosed at an early stage of the disease. The major drawback of prognostic markers already described to identify patients at risk of rapid evolution is the cost and the complexity of technical procedures, limiting routine clinical use of these parameters.
Aims: As the technic is easily implementable in routine lab and cost effective, this study is planned to assess the prognostic significance of serum Free Light Chain (sFLC) assay at diagnosis and to evaluate the relationship between sFLC levels and minimal residual disease during follow-up of treated patients.
Methods/Results: We analyzed data from 267 patients with chronic lymphocytic leukemia. sFLC levels were evaluated at diagnosis in 192 patients. Approximatively 40% of them received a treatment at the end of the study, after a median follow-up of 30 months. Abnormal sFLC ratio was observed at diagnosis in 33,8% of patients. Median time to first treatment was shorter in patients with abnormal sFLC ratio (p <0,0001) regardless of clinical stage. Beyond a threshold determined at 38.4 mg/L, the sum of the free light chains κ and λ allowed to predict, even more significantly and independently, the risk of treatment (p <0,001).
Interestingly, after treatment completion, the persistence of an abnormal sFLC κ/λ ratio was associated with positive MRD (> 0,01%) on peripheral blood with a 93,1 % positive predictive value. The median survival time before the next treatment was significantly shorter for patients with abnormal $\kappa+\lambda$ or abnormal κ/λ ratio, similarly to MRD. More generally, the minimal residual disease appeared to evolve over time in the same way than κ/λ ratio and sum of $\kappa+\lambda$.
Conclusion: These results could be of value in the management of patients at diagnosis, so as to identify patients at risk of rapid evolution, and after treatment, when increasing numbers of studies are examining the adaptation of treatment to minimal residual disease. However, these observations need to be confirmed in standardized studies on a larger scale

Key words : Chronic lymphocytic leukemia - Serum free light chains - Minimal residual disease - Prognostic factors - Time Free Survival

Résumé :

Intérêt du dosage des chaines légères libres sériques dans la leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie fréquente pour laquelle l'évolution clinique est très hétérogène, en particulier chez les patients diagnostiqués à un stade précoce. Les marqueurs pronostiques déjà proposés pour identifier les patients à risque d'évolution rapide posent pour la plupart le problème d'un accès très limité.
L'objectif de ce travail est d'étudier l'intérêt du dosage des chaines légères libres sériques, facilement réalisable et au coût relativement faible, au moment du diagnostic en tant que marqueur pronostique, ainsi qu'au cours du suivi de patients atteints de LLC en évaluant sa relation avec le taux de maladie résiduelle.
Une analyse des données de 267 patients pris en charge à l'institut Bergonié pour une LLC a été réalisée. Les dosages de chaines légères libres sériques ont été effectués au diagnostic chez 192 patients. Environ 40% d'entre eux avaient été traités à la fin de l'étude, après une médiane de suivi de 30 mois. Soixante-cinq patients présentaient au diagnostic un ratio κ/λ anormal. La médiane de survie sans traitement était plus courte chez les patients avec un ratio κ/λ anormal au diagnostic, chez l'ensemble des patients et notamment chez les patients en stade A (p <0,001). Au-delà d'un seuil déterminé à 38,4 mg/L, la somme des chaines légères libres κ et λ permettait également de prédire, de façon plus significative encore et indépendante, le risque de mise sous traitement (p <0,001).
Au cours du suivi post-traitement de la maladie, la présence d'un déséquilibre du ratio κ/λ était associée à une maladie résiduelle supérieure à 0,01% dans 93,1% des cas. De façon similaire à ce qui a pu être observé pour la MRD, le temps médian de survie avant le traitement suivant était significativement plus court pour les patients avec un ratio κ/λ anormal ou une somme $\kappa+\lambda$ anormale. Plus généralement, la maladie résiduelle semblait évoluer au cours du temps de la même façon que le ratio κ/λ et la somme $\kappa+\lambda$.
Ces observations nécessitent d'être confirmées dans de nouvelles études standardisées à plus grande échelle mais pourraient être des informations intéressantes dans la prise en charge du patient au diagnostic, afin de cibler les patients à risque d'évolution rapide, ainsi qu'au cours du suivi, à l'heure où de nombreuses études s'intéressent à l'adaptation des traitements à la maladie résiduelle.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : PHARMACIE – BIOLOGIE MEDICALE

MOTS-CLES : Leucémie lymphoïde chronique – Facteurs pronostiques – Chaines légères libres – Maladie résiduelle – Survie sans traitement

---

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Laboratoire de l'Institut Bergonié
Institut Bergonié – 229 cours de l'Argonne – 33000 Bordeaux

Directeur de thèse : Madame le Docteur Françoise Durrieu