

**UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**FACULTÉS DE MÉDECINE**

---

ANNÉE 2017

2017 TOU3 1624

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**  
**MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE**

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Martin GAUTHIER**

le 11 octobre 2017

**SUIVI DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE APRÈS**  
**IMMUNOCHIMIOTHERAPIE PAR RITUXIMAB, FLUDARABINE ET**  
**CYCLOPHOSPHAMIDE EN PREMIERE LIGNE DE LEUCEMIE**  
**LYMPHOÏDE CHRONIQUE : IMPLICATIONS POUR LA PRISE EN**  
**CHARGE THÉRAPEUTIQUE**

Directeur de thèse : Pr Loïc YSEBAERT

**JURY**

Monsieur le Professeur Christian RECHER	Président
Madame le Professeur Odile BEYNE-RAUZY	Assesseur
Monsieur le Professeur Loïc YSEBAERT	Assesseur
Madame le Docteur Françoise HUGUET	Assesseur
Madame le Docteur Lucie OBERIC	Suppléant
Monsieur le Docteur Willy VAILLANT	Membre invité

## Liste des abréviations

ADCC : antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity  
ADN : acide désoxyribonucléique  
APRIL : a proliferation-inducing ligand  
ARN : acide ribonucléique  
ASO-PCR : allele-spécifique-oligonucléotide polymerase chain reaction  
ATM : ataxia telangiectasia mutated  
BAFF : B-cell activated factor  
BCL2 : B-cell lymphoma 2  
BCR : B-cell receptor  
BIRC3 : baculoviral IAP repeat containing 3  
B-PLL : leucémie prolymphocytaire B  
BTK : Bruton tyrosine-kinase  
CDR3 : complementarity determining region 3  
CHG : centre hospitalier général  
CHU : centre hospitalier universitaire  
CMF : cytométrie en flux  
CMV : cytomégalovirus  
CRBN : cereblon  
CSH : cellule souche hématopoïétique  
CXCR4 : CXC-chemokine receptor 4  
DLEU2 : deleted in lymphocytic leukemia 2  
EOT : end of treatment pour fin de traitement  
ERIC : European Research Initiative on CLL  
FBXW7 : F-box and WD repeat containing protein 7  
FCM : Fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone  
FDG : fluorodésoxyglucose  
FGF : fibroblast growth factor  
FISH : fluorescence in situ hybridation  
GC : germinal center  
GVL : effet greffon contre leucémie  
HLA : human leucocyte antigen  
HR : hazard ratio  
ICT : immunochimiothérapie  
*IGHV* : gène codant pour la partie variable de la chaîne lourde des immunoglobulines  
IKZF1 : Ikaros Zinc Finger Protein 1  
IKZF3 : Ikaros Zinc Finger Protein 3  
IRAK1 : IL-1 receptor- associated kinase 1  
IRF4 : interferon regulatory factor 4  
IWCLL : international workshop on chronic lymphocytic leukemia  
KIR : killer inhibitory receptor  
LBDGC : lymphome B diffus à grandes cellules  
LBM : lymphocytose B monoclonale  
LCM : lymphome à cellules du manteau  
LL : lymphome lymphocytaire  
LLC : leucémie lymphoïde chronique

LRP4 : lipoprotein receptor-related protein 4  
MDACC : MD Anderson Cancer Center  
miRNA : ARN microscopique  
MRD : minimal residual disease ou maladie résiduelle minime  
MYD88 : myeloid differentiation primary response 88  
NFκB : nuclear factor kappa B  
NFKBIE : NF light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor-ε  
NGS : next-generation sequencing  
NK : natural killer  
OS : overall survival (survie globale)  
PAMP : pathogen-associated molecular patterns  
PCR : polymerase chain reaction  
PFS : progression-free survival (survie sans progression)  
PI3K : phosphatidyl-inositol-3-kinase  
PLCG2 : phospholipase C, isoforme gamma 2  
RB : Rituximab-Bendamustine  
RB1 : retinoblastoma 1  
RC : réponse complète  
RCi : réponse complète avec récupération hématologique incomplète  
RCP : réunion de concertation pluridisciplinaire  
RF : Rituximab-Fludarabine  
RFC : Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide  
RP : réponse partielle  
PNN : polynucléaire neutrophile  
SF3B1 : splicing factor 3b subunit 1  
SNP : single nucleotide polymorphism  
SR : syndrome de Richter  
STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3  
SUV : standardized uptake value  
TEP : tomographie par émission de positons  
TLR : Toll-like receptor  
TP53 : tumor protein 53  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
WES : whole exome sequencing  
WGS : whole genome sequencing  
ZAP-70 : zeta-associated protein 70

## REMERCIEMENTS

### Membres du jury

#### **Pr Christian Récher – chef du service d’hématologie, IUCT-Oncopôle**

Je suis très honoré que tu puisses présider le jury de ma thèse. Tu nous rappelles souvent que les responsabilités inhérentes à notre métier imposent une grande rigueur, que tu t’appliques d’une manière exemplaire. Ton implication auprès des patients aussi bien que dans la recherche fondamentale et translationnelle sont un exemple pour nous les internes. Je garde par ailleurs un très bon souvenir de mon passage au secteur Ehrlich.

#### **Pr Odile Beyne-Rauzy – chef du service de médecine interne, IUCT-Oncopôle**

Tu as très vite répondu à ma demande pour faire partie de ce jury, et c’est un grand plaisir pour moi de pouvoir bénéficier de ton œil d’interniste sur ce sujet qui traite du système immunitaire. D’une manière générale, tu as toujours été disponible pour discuter des dossiers compliqués notamment de sujets âgés (un de tes nombreux domaines d’expertise), et travailler avec toi a été très agréable du temps de Purpan tout comme plus récemment lors de gardes à l’IUC.

#### **Pr Loïc Ysebaert – service d’hématologie, IUCT-Oncopôle**

Quand on travaille avec toi, on ne s’ennuie jamais ! Tu m’as encadré dans ce travail avec toujours beaucoup d’attention et de bonne humeur, et tu t’es rendu disponible jusque pendant tes vacances pour relire ce manuscrit et ses dérivés. Mes quelques lundis passés au secteur des lymphomes ont été l’occasion de discuter avec toi de sujets aussi variés qu’intéressants. Ta jovialité est précieuse pour les équipes, et ton enthousiasme pour les patients.

#### **Dr Françoise Huguet – service d’hématologie, IUCT-Oncopôle**

Je suis très heureux de pouvoir vous compter parmi les membres de mon jury. Nous nous sommes croisés à plusieurs occasions notamment autour de la leucémie myéloïde chronique et j’ai pu apprécier votre esprit de synthèse et votre capacité à prioriser les problèmes, dont je suis admiratif et espère avoir tiré des leçons. Recevez ici l’expression de mon profond respect.

#### **Dr Lucie Oberic – service d’hématologie, IUCT-Oncopôle**

Très content de pouvoir compter sur toi pour juger de ce travail de thèse. Tu es toujours bienveillante auprès des internes, et tu ne manques pas d’idées pour nous donner des travaux. Mon passage avec vous dans le secteur des lymphomes aura été bref mais il m’a beaucoup plu et j’espère pouvoir revenir avec vous dans quelque temps (en attendant je ne manque pas une occasion de remplacer chez vous).

#### **Dr Willy Vaillant – service de médecine interne, CHG Auch**

Je suis très content d’avoir pu t’inviter à siéger à ce jury. Aucune personne ayant travaillé avec toi ne peut ignorer ta grande curiosité et ton implication dans ton travail, mais ta simplicité est également précieuse. Je garde un très bon souvenir de mon passage à Auch.

## Autres professionnels de santé

**Au secteur greffe** j'ai pu faire mes premières armes en tant qu'interne, et la boucle sera bouclée dans quelques jours lorsque mon internat s'y achèvera. Anne, ton expérience en greffe m'aura été d'un grand secours à de nombreuses reprises, et tu as su être présente quand beaucoup d'événements extérieurs (heureux) te rendaient la chose difficile. Cécile, j'ai commencé mon internat (et mes oublis de garde) avec toi, ton sang-froid en toutes circonstances est une qualité dont j'espère avoir un minium hérité. Sarah, si tu étais encore interne quand je suis arrivé en hématologie, je n'ai travaillé avec toi que quand tu es passée CCA mais c'est un vrai plaisir, toujours consciencieuse et de bonne humeur ! Votre compagnie à toutes aura eu raison de mes appréhensions concernant un passage en greffe qui s'annonçait long. Je tiens aussi à remercier l'équipe paramédicale de la greffe ; sachez que je reconnais les qualités humaines nécessaires à votre exercice dans ce contexte si particulier, et que votre compagnie m'a beaucoup apporté.

**Au secteur des leucémies aiguës**, j'ai beaucoup appris avec Françoise et Christian. Suzanne je t'ai peu croisée en salle mais tu as toujours été patiente et de bon conseil tant en hôpital de jour que pour les consultations. L'équipe paramédicale m'a ici aussi beaucoup apporté, tant les anciennes ehrlichaises par leurs conseils avisés aux premières plongées dans le temple de la leucémie aiguë, que les nouvelles arrivées.

**Au secteur des lymphomes**, j'ai fait une courte incursion mais j'ai eu le plaisir de travailler dans une ambiance très sympathique en compagnie de Lucie et Loïc et aussi de Sarah, qui arrive à mener de front son activité universitaire et sa pratique clinique : sache que je suis très admiratif de ton parcours et de ta modestie. Monsieur Laurent, c'est une grande déception pour moi que de ne pas pouvoir vous compter parmi les membres du jury ; vous ouvrez les internes aux multiples facettes de l'hématologie, et vos visites impromptues dans le bureau de l'hôpital de jour sont toujours très instructives. Enfin, je ne compte pas les bons moments passés avec l'équipe paramédicale du secteur lymphomes, à toute heure.

**Mais aussi à l'hôpital de jour**, Murielle tes qualités médicales tant dans la greffe que dans le myélome ou l'amylose sont un soutien très important pour nous les internes, et ton franc-parler a du bon. Benjamin, pour ton expertise dans le myélome.

**Pour ceux qui sont en devenir** : Pierre-Luc, tu as toujours beaucoup de choses à raconter ce qui anime pas mal de nos pauses café, et tu tiens le lave-vaisselle de l'internat à merveille. Noémie, calme et la tête froide, j'espère que tu vas poursuivre ton chemin aussi sereinement que tu l'as débuté. Tu es toujours là pour rendre service et nous ne comptons plus les gardes « à problème » que tu as prises pour nous arranger. Benoît, tu nous épates par tes compétences informatiques ! Guillaume, tu es d'un calme olympien et d'une grande conscience professionnelle, ce qui n'empêche pas de passer d'excellents moments de détente en ta compagnie ; ceci m'a fait apprécier mon dernier semestre. Léopoldine, tu as passé bientôt un an avec nous et tout le monde t'apprécie déjà énormément. Hors de l'hématologie, je tiens à remercier les internes avec qui j'ai eu plaisir à travailler : Olivier et Nadia, Damien et Matthieu, Martin, Kim, François, Gaspard et Thomas, et actuellement Elvire et Soraya.

Et enfin les internes ayant maintenant terminé leur parcours d'hématologue et/ou d'oncohématologue : Caroline je te souhaite de trouver ta voie entre hématologie et infectiologie ; Sarah le semestre au labo était top, et tu es toujours disponible pour des conseils ; Anne je te souhaite de poursuivre ton parcours déjà bien avancé ; Marie je te souhaite beaucoup de bonheur en famille.

**Dans le service de médecine interne et oncogériatrie (Purpan)**, j'ai pris beaucoup de plaisir à être dans une équipe faisant de la médecine de qualité. Laurent bravo pour ton implication au service des personnes ; Clément, pour tes métaphores et ta disponibilité ; Delphine pour ta gentillesse et tes compétences médicales.

**Les statisticiens** Élodie Martin et Thomas Filleron, pour avoir été aussi patients et gentils et pour avoir pris le temps d'organiser des rencontres à plusieurs reprises afin d'éclaircir les points qui le nécessitaient. Pour avoir fait les tests statistiques avec autant de réactivité.

**Dans le service de médecine interne (IUCT-O)**, je tiens à remercier Odile mais aussi Karen, toi que l'on peut solliciter parfois plusieurs fois par jour pour les infections compliquées ; Thibault pour ta pédagogie et ton humour ; Pierre pour ta disponibilité constante ; Sylvie pour ton implication dans les controverses ; Monsieur Adoue pour nous apprendre à toujours tout remettre en question.

**En réanimation à l'IUCT-O**, je remercie Muriel pour ta grande implication, mais aussi Damien et Guillaume pour votre côté professionnel mais aussi détendu, ainsi que Jean pour tes conseils dans la gestion des diverses défaillances.

**Au laboratoire d'hématologie**, je tiens à remercier François, la perle du laboratoire, débordant d'idées et d'enthousiasme, toujours prêt à nous expliquer ce que l'on n'a pas compris sur l'hématopoïèse ; Mickael, disponible pour les questions sur les phénotypes atypiques ; Sophie pour les anomalies de l'hémostase.

**Au laboratoire de pharmacologie**, Fabien pour tes conseils en communication et la confiance que tu m'as faite, Sandra pour ta gentillesse et ton implication dans les différentes parties de la nébuleuse Captor, Émilie, Cécile, Manuella, Guillaume et surtout Aurore pour vos conseils en stats, Maryse pour votre regard critique mais optimiste sur le SNIIRAM.

**Mais aussi** dans le service de médecine interne d'Auch (Sophie, Karine et Frédéric), en oncologie (Loïc), et aux Limougeauds m'ayant donné l'envie de faire de l'hématologie (Prs Bordessoule et Jaccard, Drs Moreau et Piguet).

## Remerciements personnels

À

Astrid, pour ta présence à mes côtés, qui m'encourage et me fait aimer la vie. Pour l'amour sincère et viscéral que tu portes aux tiens. Pour ta compréhension intuitive de l'humain. Pour le chemin fait ensemble, et le chemin qu'il reste à faire.

Agathe, pour avoir tout bouleversé.

Mes parents, pour m'avoir aidé à grandir et à devenir celui que je suis, et pour n'avoir cessé de croire en ce que je faisais. Pour votre disponibilité permanente.

Mon frère Thomas, pour ta curiosité et l'intérêt que tu portes au monde scientifique au sens large. Contraint par le monde matériel j'ai dû avoir recours à des tests statistiques, j'espère ne pas avoir trop fauté !

Tous mes amis avec qui j'ai débuté dans la médecine à Limoges et qui sont maintenant dispersés aux quatre coins de la France et même au-delà ; mes amis d'avant qui m'ont hébergé pendant mes journées de formation à Paris et ont permis des soirées inoubliables.

Mes amis toulousains hors du milieu médical, avec qui je partage trop peu de moments.

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidémiologie</b>	<b>14</b>
1.1.1	Facteurs héréditaires	14
1.1.2	Facteurs environnementaux	14
<b>1.2</b>	<b>Physiopathologie de la LLC</b>	<b>15</b>
1.2.1	Altérations génétiques	15
1.2.2	Microenvironnement dans la LLC	19
1.2.3	Voie du BCR	20
1.2.4	Déficit immunitaire dans la LLC	21
1.2.5	Cellule d'origine et chronicité des mutations (Figure 2)	23
1.2.6	Dichotomie physiopathologique de la LLC selon le statut mutationnel <i>IGHV</i> (Figure 5)	26
<b>1.3</b>	<b>Diagnostic et pronostic</b>	<b>27</b>
1.3.1	LLC et lymphocytose B monoclonale	27
1.3.2	Pronostic	28
<b>1.4</b>	<b>Complications de la LLC</b>	<b>32</b>
1.4.1	Infections	32
1.4.2	Manifestations auto-immunes	32
1.4.3	Seconds cancers	32
1.4.4	Transformation pro-lymphocytaire	32
1.4.5	Syndrome de Richter	33
<b>1.5</b>	<b>Prise en charge thérapeutique</b>	<b>34</b>
1.5.1	Indications thérapeutiques	34
1.5.2	Outils thérapeutiques	34
1.5.3	Surveillance après traitement	38
1.5.4	Stratégie thérapeutique	38
<b>1.6</b>	<b>Maladie résiduelle dans la LLC</b>	<b>39</b>
1.6.1	Rationnel pour la mesure de la MRD dans la LLC	39
1.6.2	Méthodes de détection de la MRD	40
1.6.3	Signification de la MRD	44
1.6.4	Facteurs influençant le rôle pronostique de la MRD	44
1.6.5	Une mesure de la MRD en cours de traitement ?	45
1.6.6	Signification d'une MRD négative après allogreffe de cellules souches	45
1.6.7	Rôle de la MRD dans la prise de décisions	46
1.6.8	Quelles sont les limites de la mesure de la MRD ?	48
1.6.9	Questions en suspens concernant la mesure de la MRD	48
<b>2</b>	<b>Rationnel et objectifs de l'étude</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Schéma et objectifs de l'étude</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Population</b>	<b>51</b>
3.2.1	Critères d'inclusion	51
3.2.2	Critères d'exclusion	51
<b>3.3</b>	<b>Recueil des données</b>	<b>52</b>
<b>3.4</b>	<b>Analyses en cytométrie</b>	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>Critères de jugement</b>	<b>52</b>
<b>3.6</b>	<b>Définition des covariables</b>	<b>53</b>
<b>3.7</b>	<b>Analyses statistiques</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>Résultats</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Caractéristiques de la population</b>	<b>54</b>

<b>4.2</b>	<b>Résultats globaux du RFC.....</b>	<b>56</b>
<b>4.3</b>	<b>Survie sans progression – PFS .....</b>	<b>58</b>
4.3.1	Analyse Landmark à 9 mois .....	59
<b>4.4</b>	<b>Survie globale – OS.....</b>	<b>65</b>
4.4.1	Analyse Landmark à 9 mois .....	66
<b>4.5</b>	<b>Autres événements d'intérêt (cancers, infections graves et opportunistes).....</b>	<b>69</b>
<b>4.6</b>	<b>Traitements ultérieurs.....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>70</b>
5.1	Résultats principaux : comparaison avec les essais historiques .....	70
5.2	Rôle putatif de la reconstitution immunitaire normale sur la rechute de la MRD.....	71
5.3	Forces et limites de l'étude .....	72
5.4	Perspectives.....	73
<b>6</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>75</b>

#### Liste des figures

Figure 1 : microenvironnement de la LLC.....	20
Figure 2 : physiopathologie de la LLC (cellule d'origine) .....	24
Figure 3 : évolution clonale dans la LLC .....	25
Figure 4 : exemple d'évolution clonale après traitement de la LLC par RFC.....	25
Figure 5 : dualité physiopathologique selon le statut mutationnel <i>IGHV</i> .....	27
Figure 6 : aires ganglionnaires de la classification de Binet .....	29
Figure 7 : utilité de la MRD dans différentes situations .....	40
Figure 8 : exemple de MRD positive à 0,2 % .....	43
Figure 9 : mécanisme d'action du lenalidomide dans la LLC .....	47
Figure 10 : distribution des valeurs de CD4/mm <sup>3</sup> à EOT et aux différentes visites de suivi.....	57
Figure 11 : distribution des valeurs de MRD (en %) à EOT et aux différentes visites de suivi. ....	57
Figure 12 : PFS en fonction du groupe de MRD à EOT .....	59
Figure 13 : PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT.....	59
Figure 14: PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT, sous-groupe MRD EOT basse .....	62
Figure 15 : PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT, sous-groupe MRD EOT int. ....	62
Figure 16 : PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT - sous-groupe <i>IGHV</i> non muté.....	63
Figure 17 : PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT - sous-groupe <i>IGHV</i> muté .....	63
Figure 18 : PFS en fonction de la positivité de la MRD à EOT - sous-groupe <i>IGHV</i> non muté.....	64
Figure 19 : PFS en fonction de la positivité de la MRD à EOT - sous-groupe <i>IGHV</i> muté.....	65
Figure 20 : OS en fonction du groupe de MRD à EOT.....	67
Figure 21 : OS en fonction du groupe de CD4 à EOT. ....	67

#### Liste des tableaux

Tableau 1 : classification de Binet .....	29
Tableau 2 : classification de Ra .....	30
Tableau 3 : poids pronostique des variables du score CLL-IPI .....	31
Tableau 4 : groupes pronostiques définis par le score CLL-IPI .....	31
Tableau 5 : historique des associations de chimiothérapie/ICT avec leurs résultats.....	35
Tableau 6 : différentes méthodes de mesure de la MRD .....	41
Tableau 7 : avantages et inconvénients de la CMF et de la biologie moléculaire pour l'étude de la MRD dans la LLC .....	43
Tableau 8 : caractéristiques pré-thérapeutiques de la population .....	55
Tableau 9 : résultats globaux du RFC .....	56
Tableau 10 : facteurs initiaux et PFS : analyse univariée.....	58
Tableau 11 : analyse multivariée - PFS à 5 ans.....	60
Tableau 12 : analyses bivariées pour la PFS concernant la valeur à EOT et la croissance de la MRD et des cellules immunitaires normales..	61
Tableau 13 : facteurs initiaux et OS : analyse univariée .....	66
Tableau 14 : analyses bivariées pour l'OS concernant la valeur à EOT et la croissance de la MRD et des cellules immunitaires normales .....	68
Tableau 15 : analyse multivariée - OS à 5 ans .....	69

**TABLEAU du PERSONNEL HU**  
**des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier**  
**au 1<sup>er</sup> septembre 2016**

**Professeurs Honoraires**

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques
Doyen Honoraire	M. LAZORTHE Yves	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. LAZORTHE Franck
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHWEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. FORTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. CABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. ESCAT Jean		
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel		
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques		
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard		

**Professeurs Émérites**

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur SALVAYRE Bernard
Professeur MURAT	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur LOUVET P.	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur Jacques LAGARRIGUE
Professeur CARATERO Claude	
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	
Professeur COSTAGLIOLA Michel	
Professeur ADER Jean-Louis	
Professeur LAZORTHE Yves	
Professeur LARENG Louis	
Professeur JOFFRE Francis	
Professeur BONEU Bernard	
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	
Professeur MAZIERES Bernard	
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth	
Professeur SIMON Jacques	
Professeur FRAYSSE Bernard	
Professeur ARBUS Louis	

## FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépat-Gastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génélique
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BONNEVILLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BRASSAT David	Neurologie	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie	M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. GAME Xavier	Urologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. LOPEZ Raphael	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale	M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. LANGIN Dominique	Nutrition	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne	M. PERON Jean-Marie	Hépat-Gastro-Entérologie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. MALAUAUD Bernard	Urologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique	Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses	Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. MAZIERES Julien	Pneumologie	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie		
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carlé	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépat-Gastro-Entérologie		
<b>P.U. Médecine générale</b>		<b>P.U. Médecine générale</b>	
M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale	M. MESTHÉ Pierre	Médecine Générale
		<b>P.A Médecine générale</b>	
		POUTRAIN Jean-Christophe	Médecine Générale

## FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

### P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARLET Philippe (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis	Hépat-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie, Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GÜIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LAURENT Guy (C.E)	Hématologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MARTY Nicole	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP Patrice (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

### P.U. - P.H. 2ème classe

M. ACCADBLE Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
Mme DÜLY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STOWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. LAFFOSSE Jean-Michel	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LEGUEVAQUE Pierre	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREUEW Juliette	Dermatologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

Professeur Associé de Médecine Générale  
Pr STILLMUNKES André

Professeur Associé en O.R.L  
Pr WOISARD Virginie

**M.C.U. - P.H.**

M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétiq
Mme BONGARD Varina	Epidémiologie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANDET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Annie	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
M. MONTÓYA Richard	Physiologie
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NÓGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophthalmologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie

**M.C.U. Médecine générale**

M. BRILLAC Thierry

**M.C.U. - P.H.**

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
M. CMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoît	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétiq
Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoît	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS François	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGÉZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

**M.C.U. Médecine générale**

M. BISMUTH Michel	Médecine Générale
M. BISMUTH Serge	Médecine Générale
Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale

Maitres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves  
Dr CHICOLAA Bruno  
Dr IRI-DELAHAYE Motoko  
Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierré  
Dr ANE Serge  
Dr BIREBENT Jordan

# 1 Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC), leucémie la plus fréquente dans les pays occidentaux (1), est une hémopathie lymphoïde de bas grade. Si elle est majoritairement sporadique avec peu de facteurs de risque reconnus, elle peut également s'inscrire dans le cadre d'une famille présentant des antécédents de LLC ou d'autre lymphome non hodgkinien.

Bien que dénommée leucémie lymphoïde chronique, il s'agit d'une hémopathie dérivant du lymphocyte B mature. Cette dénomination tient à la lymphocytose constatée dans cette maladie et étant un critère diagnostique : le diagnostic de LLC requiert au moins 5000 lymphocytes clonaux par  $\text{mm}^3$  présentant des caractéristiques phénotypiques spécifiques et persistant au moins 3 mois. La contrepartie exclusivement tumorale de la LLC est le lymphome lymphocytaire (LL), qui partage les mêmes caractéristiques physiopathologiques et évolutives que la première, et qui est regroupé avec elle dans une même entité nosologique (2,3).

Bien que présentant des caractéristiques phénotypiques singulières et constantes, sous le cadre nosologique de LLC sont regroupées deux types de maladies distinctes, selon leur statut mutationnel pour le gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines.

## 1.1 Epidémiologie

La LLC a une incidence estimée à environ 3,8 cas pour 100 000 habitants par an (1). Elle atteint les hommes deux fois plus fréquemment que les femmes, et l'âge médian au diagnostic est de 70 à 72 ans selon les études. Il est reconnu que l'origine ethnique influe sur le risque de développer une LLC ; ceci est particulièrement bien documenté aux Etats-Unis où l'incidence est retrouvée la plus importante chez les caucasoïdes, et la plus faible chez les patients d'origine asiatique ou d'Océanie (4).

### 1.1.1 Facteurs héréditaires

L'existence d'une susceptibilité génétique à développer une LLC est corroborée par plusieurs données : les apparentés au premier degré de patients ayant une LLC ont un risque relatif de développer eux-mêmes une LLC évalué à 8,5 (5,6) ; de plus, les jumeaux monozygotes de patients porteurs d'une LLC se voient plus souvent diagnostiquer eux-mêmes des LLC que leurs jumeaux dizygotes (7). Il est intéressant de noter que cette susceptibilité génétique aux syndromes lymphoprolifératifs ne semble pas restreinte à la LLC dans la mesure où les apparentés au premier degré de patients porteurs d'une LLC ont également un sur-risque de développer un autre lymphome indolent (5). Des polymorphismes nucléotidiques (SNP) sont potentiellement impliqués dans ces formes familiales, et concerneraient notamment les gènes *IRF4* et *BCL2*, ou seraient responsables de la régulation négative des miRNA *mir-15a* et *mir-16-1*. Une revue récente recense la plupart des SNP ayant un rôle dans la pathogenèse de la LLC (8).

### 1.1.2 Facteurs environnementaux

Un lien statistique a été mis en évidence entre le développement d'une LLC et le fait de vivre et/ou de travailler dans une exploitation agricole, et plusieurs données suggèrent que les insecticides et herbicides (agent orange) augmenteraient le risque de LLC (9,10). Les autres facteurs de risque identifiés dans la population occidentale sont les antécédents familiaux

d'hémopathie maligne (tous types confondus), certains facteurs environnementaux (métier de coiffeur), la taille élevée et le fait d'avoir une sérologie positive pour l'hépatite C. Certains facteurs ont par ailleurs été retrouvés comme associés à un risque amoindri de développer une LLC ; il s'agit du terrain atopique, du fait d'avoir un antécédent transfusionnel, l'exposition solaire importante et le fait de fumer (11).

## 1.2 Physiopathologie de la LLC

### 1.2.1 Altérations génétiques

#### 1.2.1.1 Anomalies chromosomiques

Environ 80 % des malades porteurs de LLC ont une ou des anomalies chromosomiques récurrentes permettant de stratifier le pronostic des patients – identification des anomalies par FISH, sans prise en compte du statut mutationnel *IGHV* (12). Il s'agit essentiellement de pertes ou de gains de matériel chromosomique ; les translocations réciproques sont plus rares.

**Les délétions 13q14** sont les anomalies chromosomiques récurrentes les plus fréquemment retrouvées (50-60 % des cas), sont généralement mono-alléliques et sont plus fréquemment retrouvées dans les LLC *IGHV* mutées. Elles sont fréquemment retrouvées isolément, si bien que leur rôle dans la pathogenèse même de la LLC est suspecté (d'autant que la délétion du cluster *DLEU2-mir-15-16* chez la souris reproduit un syndrome lymphoprolifératif B proche de la LLC (13)). Elles sont en général associées à un bon pronostic, particulièrement lorsqu'aucune autre anomalie n'est détectée en FISH. La taille de la région délétée est variable mais comprend constamment le cluster *DLEU2-mir-15-16*, qui régule l'expression de protéines anti-apoptotiques ou impliquées dans le cycle cellulaire (TP53, BCL2 et CCND1 notamment). Le bon pronostic qui leur est associé n'est pas observé chez les patients chez qui le locus du gène *RB1* fait partie de la région délétée (14). Notons que cette délétion n'est pas exclusivement retrouvée dans la LLC puisqu'elle est récurrente dans d'autres hémopathies lymphoïdes B matures telles que le lymphome du manteau (LCM), ou encore dans des carcinomes (prostate, par exemple).

**La trisomie 12** est retrouvée chez 16 % des patients (indépendamment du statut mutationnel *IGHV*) et est associée à un pronostic intermédiaire. Son rôle dans la pathogénie de la LLC est inconnu. Les patients porteurs de cette anomalie ont une plus grande propension à développer des cancers secondaires et des syndromes de Richter ; lorsque cette anomalie est associée à une mutation de *NOTCH1*, son pronostic est moins favorable (15). Elle serait mutuellement exclusive avec la del17p mais souvent associée à d'autres anomalies caryotypiques, qu'elles soient de bon (trisomies 18 et 19, t(14;18)) ou de mauvais pronostic (t(14;19), t(8;14), del14q).

**Les délétions 11q22-23** sont observées chez 18 % des patients et sont associées à un statut *IGHV* non muté et à un syndrome tumoral important. Ces délétions sont hétérogènes mais toujours de grande taille et comprennent classiquement les locus des gènes *ATM* et *BIRC3*, le premier codant pour une protéine ayant un rôle crucial dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN ; lorsque la zone délétée ne comprend pas ce locus, elle comprend celui du gène *BIRC3*, codant une protéine inhibitrice de la voie NFκB alterne. Ces délétions sont fréquemment mono-alléliques et non systématiquement associées à une mutation de l'allèle complémentaire (36 % de mutations du gène *ATM* restant, 5 % du gène *BIRC3*, suggérant

une haplo-insuffisance à l'état mono-allélique). Cependant des délétion bi-alléliques ont été associées à un pronostic plus défavorable en termes de survie globale (16). Les cellules de LLC avec délétion 11q sont sujettes à une instabilité génétique importante et à des anomalies caryotypiques additionnelles, ainsi qu'à une chimiorésistance plus élevée. Dans le cadre particulier de l'étude de la maladie résiduelle (MRD), la présence d'une délétion 11q est associée à une remontée plus rapide de la MRD après fin de traitement par immunochemiothérapie (17).

**Les délétions 17p13** sont retrouvées dans 7 % des LLC au diagnostic, plus fréquemment dans les formes *IGHV* non mutées. Elles sont, comme dans tous les cancers connus pour cette délétion caractérisée par la perte du gène *TP53*, associées à un mauvais pronostic. A la rechute elles sont beaucoup plus fréquentes, expliquant la chimiorésistance plus importante dans ce cas de figure (30 % des cas en rechute, et 50 % des cas en situation réfractaire). Il est retrouvé une inactivation de *TP53* sur le second allèle par mutation de manière très fréquente (80 %). Cependant cette mutation complémentaire n'est pas indispensable pour que la délétion 17p confère un pronostic défavorable à la maladie ; ceci témoigne d'un effet dominant négatif de la del17p sur le second allèle. De plus, la présence de mutations sous-clonales de *TP53* sans délétion 17p a été rapportée de manière récurrente et confère également un pronostic défavorable (18). La del17p et/ou la mutation *TP53* est associée à une instabilité chromosomique importante car la protéine TP53 permet normalement la réparation de l'ADN et l'induction d'apoptose des cellules endommagées. L'arrivée des nouveaux médicaments de type inhibiteurs du BCR et de BCL2 a permis d'amoindrir l'impact pronostique négatif de la del17p dans la LLC, sans pour autant l'effacer complètement.

**D'autres anomalies récurrentes** sont décrites dans la LLC, comme la délétion 6q (6 % des cas), le gain 2p (7-10 % des cas), et de manière plus rare les trisomies 18 et 19, le gain 8q24, la délétion 8p, la délétion 14q ou les réarrangements impliquant le locus d'*IGH* (voir ci-dessous).

**Un caryotype complexe** est défini par la présence d'au moins 3 anomalies caryotypiques, mais cette définition va sans doute évoluer pour inclure au moins 5 anomalies. Sa présence est associée à un pronostic défavorable, y compris chez les patients présentant une délétion 13q isolée en FISH et chez les patients *IGHV* mutés (19–22). Le caryotype complexe est associé à un temps jusqu'à premier traitement raccourci. Son impact pronostique défavorable est également retrouvé chez les patients traités par l'ibrutinib, peut-être moins avec R-Idelalisib, mais de telles données sont préliminaires, et même absentes pour ce qui concerne les inhibiteurs de BCL2 (23,24).

**Des échanges de matériel chromosomique** sont également retrouvés de manière plus rare mais néanmoins récurrente dans la LLC. D'une manière générale, la présence d'une translocation est associée à un moins bon pronostic que son absence (25). Il existe plusieurs translocations impliquant le locus *IGH* (26), comme ceci est constaté dans d'autres hémopathies lymphoïdes B. Les plus fréquentes sont les suivantes (27) :

- La t(14;18)(q32;q21) de type *IGH-BCL2*. Cette translocation est retrouvée dans moins de 2 % des LLC, exclusivement chez des patients *IGHV* mutés et est associée à un pronostic favorable.

- La t(14;19)(q32;q13) de type *IGH-BCL3* est de pronostic défavorable avec un sur-risque de développer un syndrome de Richter (28).
- La t(8;14)(q24;q32) de type *IGH-MYC*. Ces patients représentent 0,2 % des cas de LLC et présentent un taux de pro-lymphocytes plus élevé et un pronostic plus sombre que les patients ne présentant pas cette anomalie (29,30).
- D'autres comme la t(2;14)(p12;q32) de type *IGH-BCL11A*, la t(6;14)(p21;q32) de type *IGH-CCND3* ou la t(7;14)(q21;q32) de type *IGH-CDK6*. Ces anomalies seraient associées à un pronostic défavorable (31).

### 1.2.1.2 Mutations ponctuelles

L'avènement récent des techniques de séquençage du génome ou de l'exome dans leur intégralité (respectivement WGS pour whole genome sequencing et WES pour whole exome sequencing) a permis de déterminer avec précision le taux mutationnel de la LLC. On estime actuellement qu'il existe entre 10 et 30 mutations non silencieuses par patient (un peu plus fréquentes dans les LLC *IGHV* mutées), un chiffre à peu près similaire à ce qui est constaté dans les leucémies aiguës, mais moins important que ce qui est observé dans d'autres hémopathies lymphoïdes B (lymphome B diffus à grandes cellules ou LBDGC, lymphome de Burkitt, myélome multiple), et nettement inférieur à ce qui est observé dans les tumeurs solides. Au total, environ 3000 gènes ont été retrouvés mutés dans la LLC. Les mutations les plus fréquemment observées concernent les gènes *TP53*, *SF3B1* et *NOTCH1*. Les études de WGS et WES ont permis de déterminer l'impact pronostique de certaines associations de mutations (double ou triple *hit*) (32). Les mutations récurrentes les plus fréquentes sont détaillées ci-dessous.

**Mutations de la voie NOTCH.** Les mutations de la partie codante de *NOTCH1* sont des mutations activatrices retrouvées dans environ 10 % des LLC, beaucoup plus fréquemment dans les formes *IGHV* non mutées ; par contre, 40 % des LLC avec trisomie 12 présentent une mutation de *NOTCH1*, et cette association constituerait un facteur de risque important de syndrome de Richter. Les patients ayant une mutation de *NOTCH1* ont un pronostic défavorable, et l'adjonction d'un anti-CD20 à une chimiothérapie ne semble pas avoir d'impact sur le taux de réponse dans ce sous-groupe de patients dont les cellules montrent une moins forte expression membranaire de CD20 (33,34). Notons que certaines mutations de la partie 3' non transcrite du gène *NOTCH1* ainsi que des mutations de *FBXW7* ont été retrouvées de manière récurrente chez des patients avec une LLC ne présentant pas de mutation de *NOTCH1*, suggérant que la voie NOTCH est importante dans la pathogenèse de cette maladie (bien qu'elle demeure actuellement considérée comme passager car ne concernant souvent pas 100 % des cellules du clone).

**Mutations de gènes clé de la réparation de l'ADN.** Il s'agit essentiellement des mutations des gènes *ATM* et *TP53*, détaillées ci-dessus. Dans les deux cas il s'agit de mutations inactivatrices et la plupart du temps sous-clonales, associées à un mauvais pronostic. Il est important de noter que les mutations de *TP53* ont un pronostic défavorable quelle que soit la taille du clone muté (18). Il a même été montré un impact pronostique de la présence de mutations de *TP53* mises en évidence par NGS (35,36). Le niveau de mutation *TP53* qui doit faire choisir une thérapie ciblée est encore discuté, le seuil de 10 % est utilisé en pratique courante.

**Mutations des acteurs de l'épissage des introns et du traitement de l'ARN.** Les mutations de *SF3B1*, dont l'impact pronostique est défavorable, sont les plus documentées. Elles sont retrouvées dans environ 10 % des cas de LLC, plus souvent dans les LLC *IGHV* non mutées. La mutation K700E est la plus fréquente (50 % des mutations observées), mais toutes semblent partager une modification de l'interaction entre la protéine SF3B1 et les ARNm. Par ailleurs, d'autres éléments du spliceosome ou du traitement de l'ARN ont été retrouvés mutés de manière récurrente dans la LLC, mais de manière moins fréquente.

**Lésions génétiques activant la voie NFκB.** On recense :

- Les inactivations de *BIRC3* (par délétion ou par mutation tronquant le gène), conduisant à une activation constitutive de NFκB par défaut d'ubiquitinylation de MAP3K14, et qui sont retrouvées de manière plus importante dans les LLC résistantes à la fludarabine (associées à un mauvais pronostic).
- Les mutations de *MYD88*. Il s'agit essentiellement de la mutation L265P qui est très fréquente dans les maladies de Waldenström (et dans une moindre mesure dans les LBDGC de phénotype ABC). Dans la LLC, elle est retrouvée chez des patients jeunes dans 5 % des cas environ, et très majoritairement chez des patients *IGHV* muté et/ou présentant une délétion 13q (serait associée à un pronostic favorable). *MYD88* est une protéine impliquée dans la voie des TLR, et la mutation L265P augmente la liaison entre *MYD88* et *IRAK1*, activant de manière anormale une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de nombreuses cibles, notamment *STAT3* et NFκB.
- Les mutations inactivatrices de *NFKBIE*, empêchant ce dernier d'exercer son activité de maintien des dimères de NFκB hors du noyau, ce qui aboutit à l'augmentation de la translocation nucléaire de NFκB.

**Mutations conférant une résistance aux inhibiteurs du BCR :** actuellement ont été mises en évidence des mutations de *BTK* et de *PLCG2* expliquant après 2 à 3 ans un échappement à l'ibrutinib ; aucune mutation ne prédit la progression avec l'idelalisib.

**D'autres mutations** sont décrites, et concernent la voie WNT (*WNT*, B-caténine, *MYC*) ou encore des mutations d'acteurs de la modification des histones.

#### 1.2.1.3 Altérations des miRNA

Les plus fréquemment altérés sont *mir-15a* et *mir-16-1* (dans 60 % des cas environ), par délétion (del13q) ou régulation négative ; ces deux miRNA ciblent notamment *BCL2* et *MCL* et sont dérégulés dans certains cas familiaux de LLC (37). D'autres miRNA sont altérés de manière récurrente dans la LLC, aboutissant notamment à une augmentation de la signalisation du BCR ou à une surexpression de *TCL1A* (lymphomagenèse dans des modèles de souris transgéniques).

#### 1.2.1.4 Modifications épigénétiques

La LLC présente une hypométhylation globale associée à une hyperméthylation localisée, ce qui est constaté dans de nombreux cancers. La méthylation présente également une hétérogénéité intra-tumorale dans cette maladie, et la complexité de méthylation au niveau individuel est corrélée avec un mauvais pronostic et des anomalies cytogénétiques défavorables.

### 1.2.2 Microenvironnement dans la LLC

La LLC est une maladie modèle pour l'étude du microenvironnement et de son influence sur le cours évolutif de celle-ci. Elle est considérée comme très dépendante de ce microenvironnement (Figure 1).

Les sites de prolifération de la LLC sont essentiellement les organes lymphoïdes secondaires, comme cela a été démontré par une augmentation importante de la signalisation NFkB dans les cellules de LLC issues de ganglions comparativement à celles issues de moelle osseuse ou du sang (38) ; de manière intéressante, cette augmentation de signalisation du BCR et d'activation de la voie NFkB est encore plus marquée dans les clones de LLC *IGHV* non muté (ce qui fait sens avec une plus grande capacité de ces LLC à proliférer).

Il existe dans les ganglions de LLC des « centres prolifératifs » au sein desquels les cellules prolifèrent *via* des interactions bidirectionnelles avec des cellules non tumorales. Quel que soit le statut mutationnel *IGHV*, les cellules de LLC sont soumises à une stimulation chronique du BCR dans ces centres.

**Les cellules stromales** de ces centres prolifératifs ont un rôle primordial pour attirer les lymphocytes B et T vers leurs zones respectives. Alors que les cellules réticulaires fibroblastiques attirent les cellules T, les cellules folliculaires dendritiques (FDC) attirent les lymphocytes B des veinules endothéliales vers les zones B grâce à la sécrétion de CXCL12 et de CXCL13, dont les récepteurs (CXCR4 et CXCR5 respectivement) sont retrouvés à la surface des cellules de LLC. Lorsque les cellules de LLC expriment la L-sélectine et l'intégrine CD49d, leur migration de la veinule endothéliale vers le ganglion est facilitée, ce qui se traduit par une prolifération plus importante et une progression plus rapide de la maladie. Les FDC sécrètent également plusieurs cytokines favorisant la survie des cellules de LLC notamment BAFF et APRIL, dont les récepteurs présents sur les cellules de LLC sont respectivement BCMA et TACI.

**Les NLC (nurse-like cells)** sont des cellules d'origine monocytaire équivalentes aux TAM des cancers solides (39). Elles participent à la progression de la maladie de plusieurs manières : en attirant les cellules de LLC par sécrétion de CXCL12 et de CXCL13, et en augmentant leur survie par l'expression membranaire de BAFF et APRIL. Par ailleurs, elles peuvent présenter des antigènes à des cellules de LLC de manière T-indépendante, par exemple la vimentine et la calréticuline qu'elles expriment à leur surface.

**Les cellules T** sont nombreuses mais peu fonctionnelles dans la LLC. Leur rôle dans la prolifération de la LLC passe essentiellement par une évasion immune médiée par les lymphocytes T régulateurs, ainsi que par un déséquilibre de la balance Th1/Th2 au profit de ces derniers (40,41). Il est intéressant de noter que les cellules T CD4<sup>+</sup> infiltrent les pseudofollicules ganglionnaires de LLC et favorisent la croissance tumorale. L'importance des cellules T *in vivo* dans la LLC a été démontré par des modèles de greffe transgéniques à des souris immunodéficientes, chez lesquelles la présence de cellules T CD4<sup>+</sup> est indispensable à la survie de cellules de LLC (42).

Les interactions se font également de la cellule de LLC vers les autres cellules du micro-environnement, en attirant des cellules favorisant leur prolifération et en modifiant le milieu à leur profit. On note par exemple la sécrétion de CCL3 et de CCL4 qui attire les lymphocytes

T et les monocytes (ces derniers se différenciant par la suite en NLC), ou bien encore la sécrétion de CCL12 et de CCL22, attirant des lymphocytes T régulateurs.

Il faut également noter que les cellules de LLC induisent des altérations fonctionnelles des lymphocytes T CD4, notamment via la sécrétion d'IL6, d'IL10 et de TGFβ. Ces altérations induisent l'épuisement et l'anergie des lymphocytes T, et les CD4 voient leur nombre augmenté dans les ganglions de LLC ; les cellules T effectrices sont diminuées et présentent une synapse immunologique déficiente. Une dysfonction des NK serait induite de la même manière par les cellules de LLC (43,44).

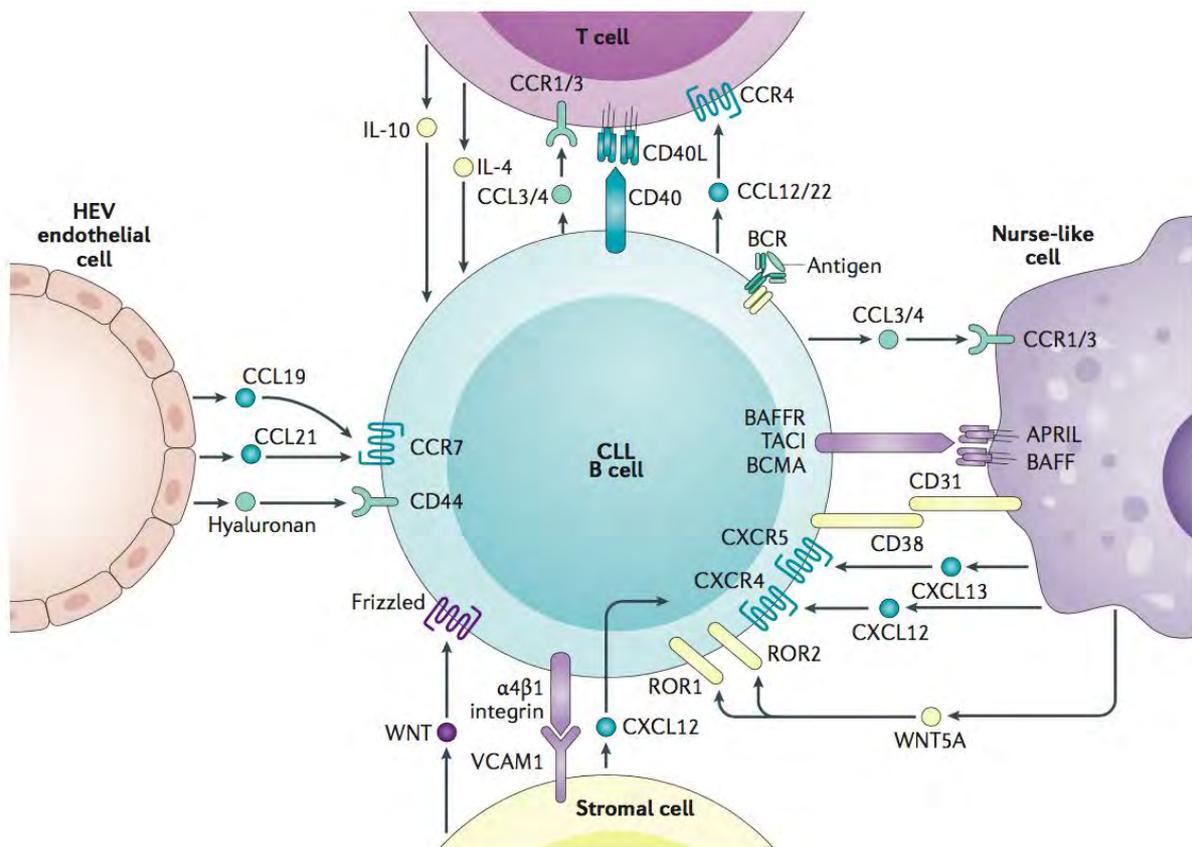


Figure 1 : microenvironnement de la LLC (centres prolifératifs), d'après (8).

### 1.2.3 Voie du BCR

Le BCR est composé d'une association entre un hétérodimère CD79A-CD79B et une immunoglobuline de surface. Dans la LLC, il existe classiquement une co-expression d'IgM et d'IgD (la présence d'une commutation isotypique est très rare et se fait principalement vers une IgG) et l'expression de l'immunoglobuline de surface est moins importante qu'elle ne l'est sur les cellules B normales. Le maintien d'un BCR fonctionnel est nécessaire à la survie des cellules de LLC (45) : après pontage des immunoglobulines de surface, l'hétérodimère CD79A-CD79B est phosphorylé, ce qui permet le déclenchement d'une cascade de signalisation intracellulaire en aval, avec formation d'un signalosome comprenant notamment BTK, SYK, PLCG2 et dont l'action est amplifiée par PI3K. La stimulation *via* des antigènes exogènes ou endogènes joue un rôle important dans l'entretien de la stimulation du BCR, et une stimulation réciproque des cellules de LLC entre elles (*via* leur CDR3) a même été mise en évidence dans certains cas (46).

Si la stimulation antigénique chronique est nécessaire au maintien de la prolifération des cellules de LLC, elle se fait selon des modalités différentes selon le statut mutationnel *IGHV*. En cas de LLC mutée, la présence d'une réponse T-dépendante permet à la cellule de rentrer dans le centre germinatif, et ainsi de procéder à l'hypermutation somatique. Dans les LLC non mutées, les antigènes suspects d'induire la prolifération sont des antigènes non protéiques qui présentent des épitopes répétés et induisent une réponse immunitaire T-indépendante (d'où l'absence de passage par le centre germinatif et l'absence d'hypermutation somatique). Dans ce cas les Toll-Like-Receptor (TLR) exprimés par les lymphocytes de LLC (notamment TLR9) vont être activés suite à la reconnaissance de PAMP ou de ligands endogènes, et induire la prolifération cellulaire. Les antigènes non protéiques en question seraient des auto-antigènes (surtout chez les patients ayant un BCR stéréotypé (47)) et des antigènes microbiens (via les TLR chez les patients ayant une mutation de *MYD88*).

Les antigènes responsables du développement de la maladie ne sont pas identifiés, même si certains BCR stéréotypés semblent interagir avec certains déterminants antigéniques. Il paraît cependant illusoire d'identifier des épitopes antigéniques activant spécifiquement le BCR des différents subsets de LLC, car il a été démontré que les LLC non mutées présentaient des BCR polyréactifs, soumis à de stimulations de faible intensité mais répétées.

La stimulation antigénique est entretenue de plusieurs manières, notamment par une modulation de l'expression membranaire de CXCR4 selon la stimulation du BCR (diminution après stimulation dans les centres prolifératifs, puis ré-augmentation progressive lors du séjour sanguin de la cellule, permettant sa réentrée dans le ganglion (48)) et par l'absence de différenciation en cellules sécrétrices d'immunoglobulines (évitant une potentielle neutralisation de l'antigène stimulant).

Il est intéressant de noter que le répertoire des immunoglobulines est biaisé : alors que les possibilités d'immunoglobulines différentes sont de l'ordre de  $10^9$  par le simple fait des recombinaisons V(D)J, on retrouve dans la LLC jusqu'à 1 % de BCR identiques, et une utilisation restreinte à quelques dizaines de VH ; en ce qui concerne le CDR3, le plus au contact de l'antigène, il a été retrouvé identique dans 25 à 30 % des LLC, y compris sur des cellules présentant des VH différents (49). Les BCR stéréotypés ont été regroupés en subsets au sein desquels les patients partagent non seulement leur région CDR3 mais également des caractéristiques évolutives (cf ci-dessous).

#### 1.2.4 Déficit immunitaire dans la LLC

Le déséquilibre du système immunitaire dans cette pathologie se traduit à la fois par une immunosuppression et par des manifestations auto-immunes. En effet, le déficit immunitaire présent explique le sur-risque de cancer des patients atteints de LLC, ainsi que leur risque infectieux majeur ; ce risque infectieux, bien qu'aggravé par les traitements et notamment les chimiothérapies, est présent dès le stade de lymphocytose B monoclonale (LBM) et est donc intrinsèque à la maladie (50). Les manifestations auto-immunes sont essentiellement représentées par des cytopénies auto-immunes, bien que d'autres manifestations aient été décrites (51).

L'immunosuppression est avant tout représentée par une hypogammaglobulinémie médiée par la sécrétion d'IL10 par les cellules T mais également par les cellules de LLC elles-mêmes. De plus, les cellules de LLC expriment PD-L1, ce qui participe à l'épuisement des cellules T effectrices exprimant PD-1.

#### *1.2.4.1 Système immunitaire inné*

De nombreux monocytes de patients atteints de LLC sont non-classiques (CD14+CD16++) et présentent des défauts d'activité de présentation des antigènes et de production cytokinique.

Un excès de cellules NK d'activité cytotoxique amoindrie (par défaut d'expression du corécepteur NKG2D, régulation positive de leur expression des KIR et suppression par les T régulateurs) a également été décrit. Les autres paramètres altérant potentiellement l'action des NK sont la baisse du ratio cellule effectrice/cellule cible (diminution potentielle des capacités d'Antibody Dependent Cell Cytotoxicity des NK), et l'expression de HLA-G par les cellules de LLC (activation du récepteur KIR des NK).

#### *1.2.4.2 Réponse immunitaire adaptative*

La dysfonction lymphocytaire B se manifeste par une hypogammaglobulinémie, alors que la dysfonction T est plus complexe. Dès les stades précoces de la LLC on constate la baisse d'au moins une classe d'immunoglobulines, qui lors de l'évolution de la maladie s'étend à toutes les classes (IgA, IgG et IgM), avec un défaut particulièrement marqué pour les IgG3 et IgG4. Cette hypogammaglobulinémie ne diffère pas selon le statut mutationnel *IGHV* et est responsable d'infections potentiellement sévères surtout lorsqu'elle concerne les IgA et/ou les IgG. L'efficacité vaccinale chez ces patients hypogammaglobulinémiques est faible et seulement partiellement améliorée par l'utilisation de vaccins conjugués (témoignant de l'altération de la réponse T helper associée).

De manière très précoce dans la LLC il existe une altération du répertoire T, et l'on sait que les CD4 et les CD8 sont élevés dans la sang, avec une augmentation plus importante des CD8 (conduisant à une diminution du rapport CD4/CD8). Cette diminution relative du nombre de CD4 pourrait être due à leur recrutement dans les centres prolifératifs (52,53).

Les cellules T CD4 et CD8 des patients ayant une LLC présentent des altérations fonctionnelles (particulièrement marquées pour les fonctions helper) et des profils d'expression génique différents de ceux constatés chez des sujets sains – concernant essentiellement les gènes de remodelage du cytosquelette et des fonctions cytotoxiques, ce qui se traduit par une synapse immunologique déficiente par défaut de polymérisation des filaments d'actine. De plus, la proportion de lymphocytes T régulateurs est augmentée dans la LLC, ce qui participerait au déficit immunitaire observé en inhibant les Th17 (diminués dans la LLC) (54,55).

Enfin, les cellules T des patients atteints de LLC sont qualitativement altérées, avec la formation de synapses immunologiques peu fonctionnelles, et des capacités prolifératives altérées ainsi qu'un phénotype d'épuisement comparable à celui observé dans les infections virales chroniques (augmentation de l'expression de CD244, CD160, PD-1).

Les cellules T (CD4 et CD8) et les NK sont élevés au diagnostic de LLC (et de LBM) et voient leur nombre diminuer avec l'évolution de la maladie. Une constatation semblable est faite pour les Th17 ; le rapport Th1/Th2 est quant à lui élevé au stade précoce de la LLC et diminue par la suite. Il y a donc toutes raisons de penser que cet état initial reflète une réponse antitumorale « limitée » par les cellules de LLC et leur microenvironnement avec

diminution des CD4, CD8, NK, Th17 au cours du temps, et diminution du rapport Th1/Th2 médiée par les lymphocytes T régulateurs (56).

#### 1.2.4.3 Les lymphocytes T régulateurs

Ils sont présents en excès dans la LLC et sont plus suppresseurs que les T régulateurs de sujets sains (41,57) ; leur nombre augmente avec l'évolution de la maladie. Ces cellules sécrètent également de l'IL10. Il semblerait exister une balance Treg/Th17 dans la LLC, un excès relatif de Treg favorisant la progression de la maladie alors qu'un excès relatif de Th17 serait observé dans des maladies de meilleur pronostic et plus volontiers associées à des cytopénies auto-immunes (induites par les lymphocytes B polyclonaux) (40,58).

#### 1.2.4.4 Les cellules de LLC, des lymphocytes B régulateurs ?

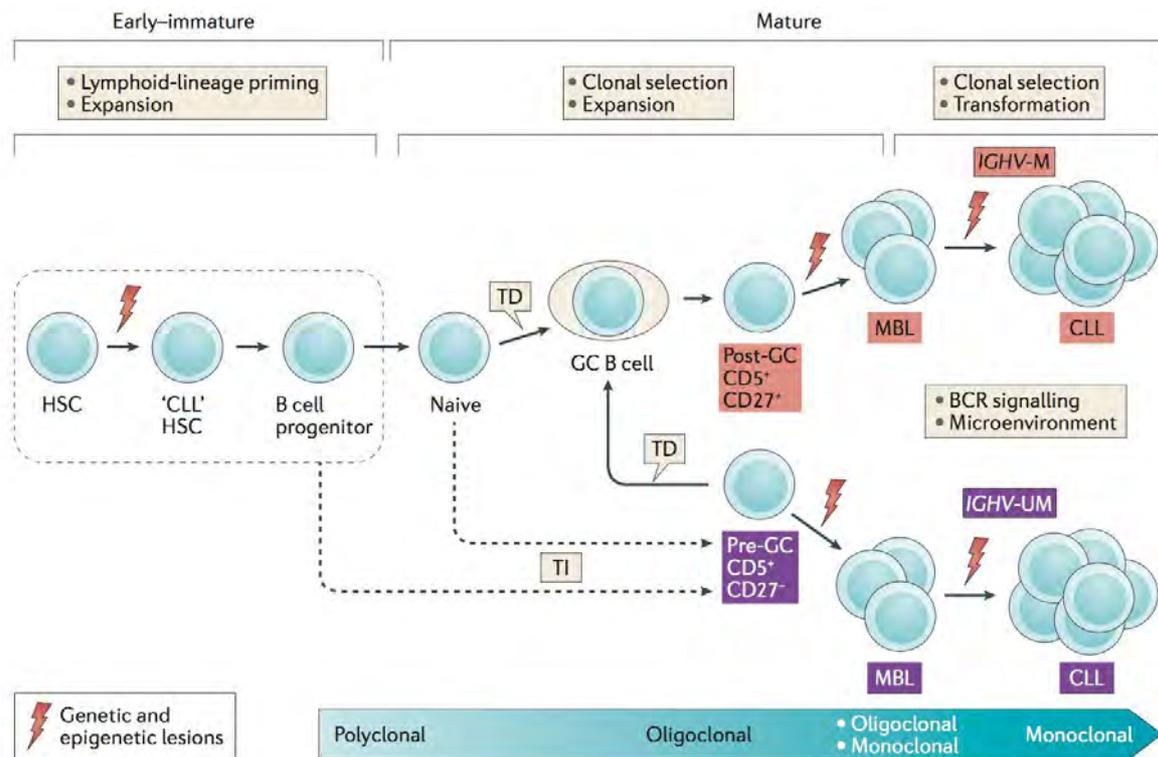
Les lymphocytes de LLC partagent de nombreuses caractéristiques avec les lymphocytes B régulateurs, cellules capables d'inhiber la prolifération lymphocytaire T (et d'induire un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur de ces derniers) et de favoriser la production de lymphocytes T régulateurs, ainsi que d'altérer la synapse immunologique.

Les points communs les plus importants sont leur faible expression d'IgM de surface, leur sécrétion d'IL10 (en réponse à de nombreux signaux présents dans le micro-environnement ganglionnaire) leur expression de CD5, du marqueur mémoire CD27 dans les LLC *IGHV* mutées, de CD1d (dans les cas de mauvais pronostic), de CD23, de CD24 ou de CD38. De plus, la faible expression de CD20 et la capacité à sécréter du granzyme B après stimulation par de l'IL21 sont deux caractéristiques partagées par les cellules de LLC et les B régulateurs. D'autres caractéristiques régulatrices (dont la présence dans la population B régulatrice normale n'est pas établie) existent également au niveau des cellules de LLC (comme l'expression de HLA-G).

#### 1.2.5 Cellule d'origine et chronicité des mutations (Figure 2)

Si la cellule à l'origine de la prolifération lymphocytaire est toujours source de débat, il est maintenant admis que les premières altérations génétiques et cytogénétiques surviennent au niveau d'une cellule-souche hématopoïétique (CSH) pluripotente : en effet, la greffe de CSH de patients porteurs de LLC à des souris immunodéficientes a permis d'observer le développement de syndromes lymphoprolifératifs (59).

Cette CSH porterait des anomalies génétiques et épigénétiques l'orientant vers une différenciation lymphocytaire B, avec expansion spontanée de progéniteurs B polyclonaux. Par la suite, une stimulation antigénique T-dépendante (LLC *IGHV* mutées) ou T-indépendante (LLC *IGHV* non mutées) permettrait l'expansion et la sélection de populations B oligoclonales. La sélection clonale se poursuivrait alors en passant par les stades LBM puis LLC. Au final, la contrepartie normale des cellules de LLC *IGHV* muté serait les lymphocytes B mémoire CD5+CD27+ ayant procédé à l'hypermutation somatique lors de leur passage dans le centre germinatif ; celle des LLC *IGHV* non muté pourrait être soit une cellule B CD5+CD27- pré-centre germinatif, soit une cellule B mémoire T-indépendante. Quoi qu'il en soit, ces cellules acquièrent des anomalies surnuméraires et font l'objet d'une sélection clonale dépendante d'une stimulation antigénique, donnant naissance à une LBM puis à une LLC (46).



**Figure 2 : physiopathologie de la LLC (cellule d'origine).** Les éclairs représentent les lésions génétiques ou épigénétiques supposées se présenter initialement dans la cellule souche hématopoïétique (CSH). TD pour stimulation antigénique T-dépendante, TI pour stimulation antigénique T-indépendante. D'après (60).

L'association des études cytogénétiques à celles de WES et de WGS a permis de découvrir une grande hétérogénéité sous-clonale dans la LLC (61,62). En effet si certaines anomalies (telles que la trisomie 12, la délétion 13q ou la mutation *MYD88*) ont été identifiées comme clonales (déjà présentes au stade de LBM), on voit apparaître par la suite des mutations « driver » sous-clonales (persistent dans le sous-clone à partir de leur apparition, à la différence des mutations « passager »). Chez chaque patient co-existent plusieurs sous-clones entrant en compétition au cours de l'évolution de la maladie. Les différents traitements administrés aux patients sélectionnent de manière darwinienne les sous-clones les plus résistants. Ainsi à la rechute le clone dominant peut-il être différent de celui présent en pré-thérapeutique ; par contre si l'ensemble des sous-clones du patient ne présente pas d'hétérogénéité en termes de chimiorésistance, la répartition des différents sous-clones restera identique jusqu'à la rechute (sauf événement aléatoire conduisant à une nouvelle mutation driver, voir Figure 3). Tous les traitements sont susceptibles de sélectionner des sous-clones résistants (notamment les mutations *TP53* en immunochimiothérapie, les mutations de *BTK* et de *PLCG2* sous ibrutinib ou encore les mutations des membres de la famille BCL-2 sous venetoclax) (63,64).

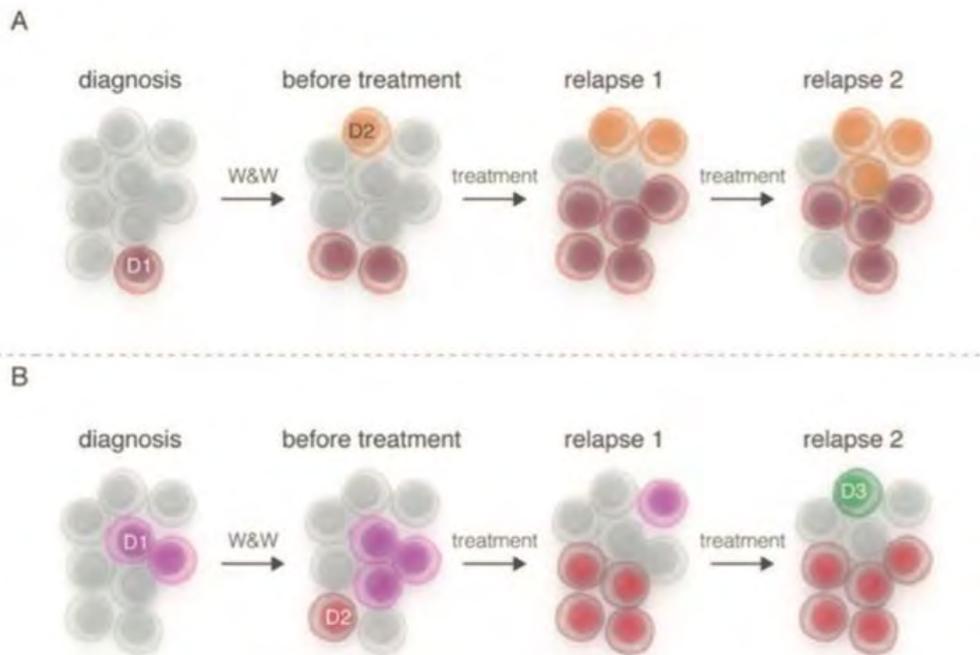


Figure 3 : évolution clonale dans la LLC. (A) le traitement a peu d'effet sur le clone majoritaire, et les sous-clones se développent via l'acquisition de nouvelles lésions génétiques. (B) : le traitement éradique le clone majoritaire, laissant la place à des sous-clones devenant à leur tour majoritaires. D pour mutation driver, W&W pour watch and wait. D'après (65)

Cette sélection des sous-clones par le traitement explique que la présence d'une délétion 17p et/ou d'une mutation de *TP53* est associée à une survie sans progression et globale plus courte indépendamment de la taille du sous-clone présentant cette anomalie (Figure 4).

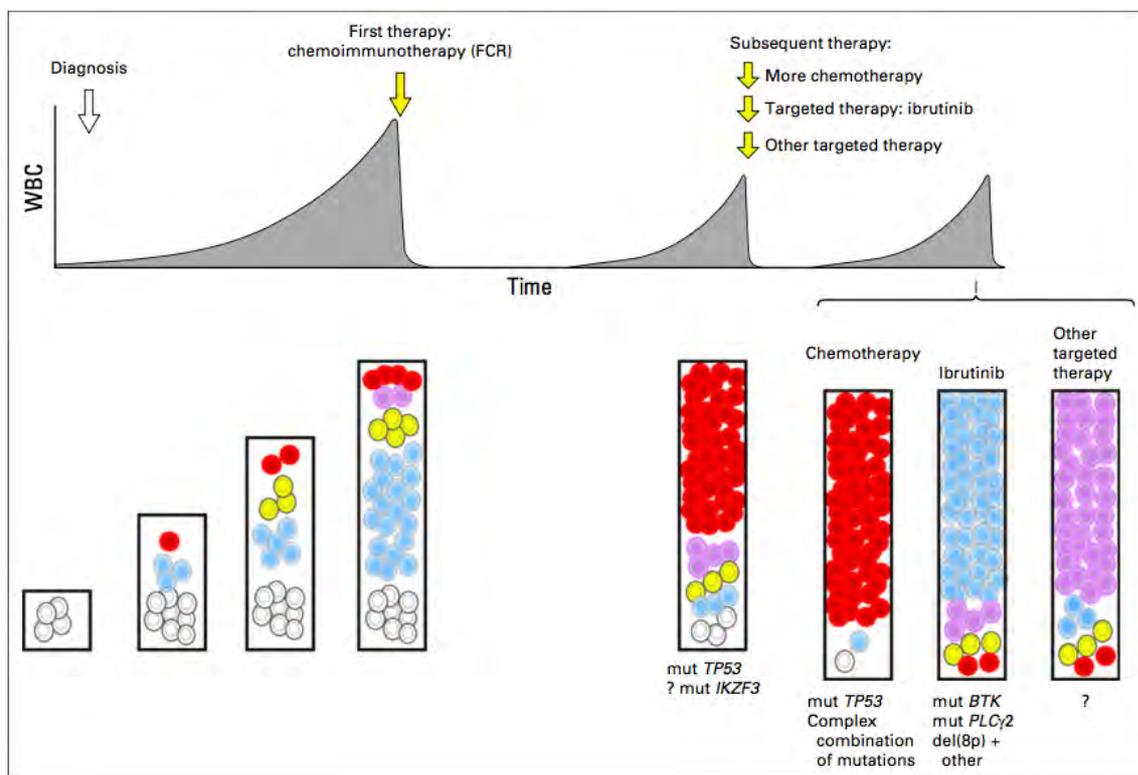


Figure 4 : exemple d'évolution clonale après traitement de la LLC par RFC. Initialement se développe une grande diversité faite de nombreux sous-clones. Sous l'effet du RFC, sélection d'un clone muté *TP53*

**(rouge). Chaque traitement proposé à la rechute façonnera à sa façon l'architecture clonale de la maladie (si chimiothérapie, persistance du clone *TP53* muté majoritairement ; si traitement par ibrutinib, sélection de sous-clones présentant une mutation de *BTK* ou de *PLCG2* ; avec une autre thérapie ciblée, sélection d'un sous-clone résistant par un mécanisme encore inconnu). D'après (66).**

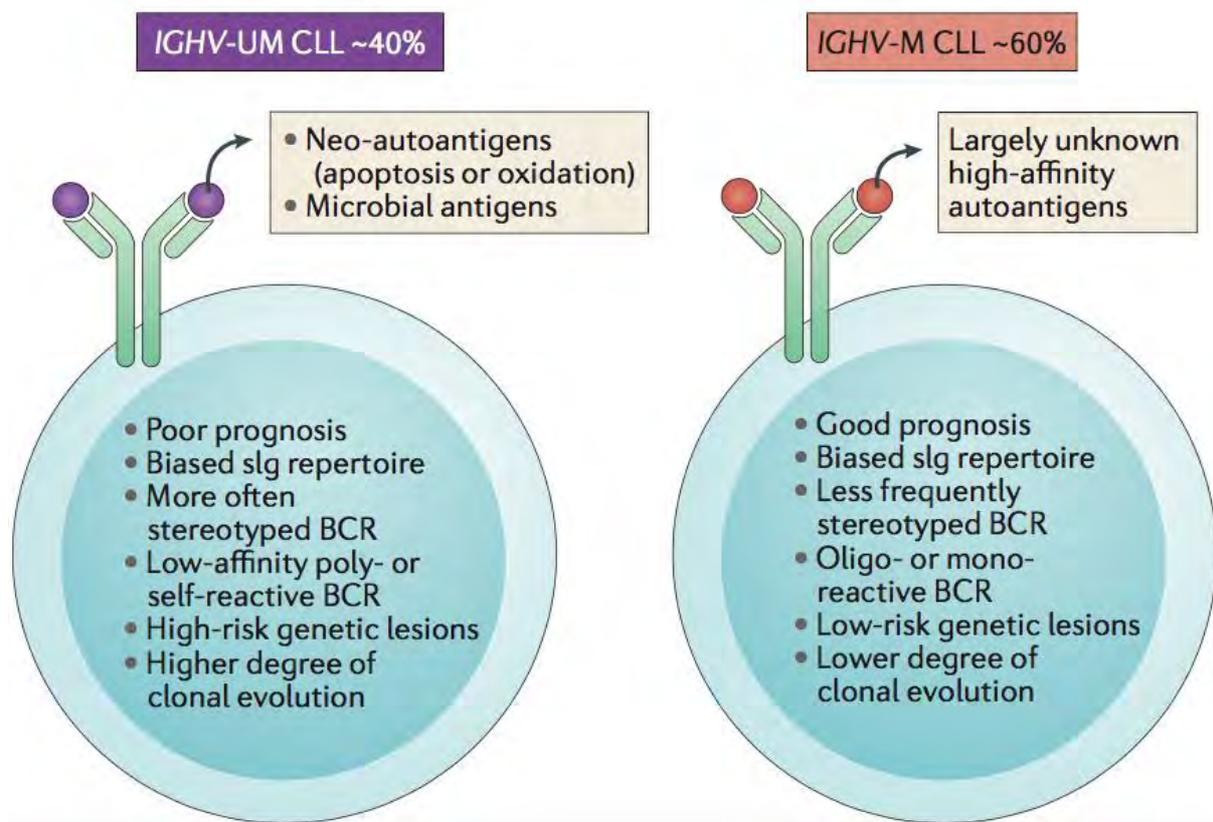
A la rechute après RFC par exemple, alors que la del13q, la del11q et la trisomie 12 sont des éléments stables par rapport à l'état pré-thérapeutique, les del17p et mutations *TP53* voient leur proportion augmenter significativement et d'autres mutations peuvent apparaître, concernant notamment *SF3B1*, *POT1* et *ATM* (61).

1.2.6 Dichotomie physiopathologique de la LLC selon le statut mutationnel *IGHV* (Figure 5)  
La LLC peut être divisée en deux catégories selon le statut mutationnel du gène *IGHV*, une caractéristique définie par le degré d'homologie du gène des immunoglobulines avec la lignée germinale (au moins 98 % d'homologie définissant les LLC non mutées, moins de 98 % les LLC mutées). Les LLC non mutées dérivent par définition de cellules n'ayant pas transité par le centre germinatif, et sont généralement plus agressives que les LLC mutées. Ces dernières présentent une hypermutation somatique témoignant de leur passage dans le centre germinatif (et rarement une commutation de classe a été opérée dans ces cellules). La valeur pronostique de ce statut mutationnel est établie depuis 1999 (67,68). Ce statut mutationnel est dépendant du clone de LLC et est donc constant au cours de l'évolution de la maladie, si bien qu'il peut être déterminé à n'importe quel moment (69–71); ceci en fait un marqueur pronostique très robuste (72). Notons que les BCR stéréotypés sont plus fréquents dans les LLC non mutées que dans les LLC mutées.

Au sein des deux groupes pronostiques définis sur la base de ce statut mutationnel, l'évolution peut varier d'un patient à l'autre, et le fait d'avoir un BCR stéréotypé (un tiers des patients) permet également la définition de groupes pronostiques selon les subsets ainsi identifiés : le subset 4 présente une évolution indolente contrairement aux subsets 1 et 2, associés à une évolution agressive. De plus l'acquisition des mutations somatiques dans les LLC au BCR stéréotypé peut être guidée par le stéréotype (73).

Cependant cette dichotomie n'est pas absolue : en effet, il a été mis en évidence un sous-type de LLC présentant une chaîne lourde mutée (97 % d'homologie avec la lignée germinale) et une chaîne légère IGLV3-21 non mutée (74,75). De plus certains subsets ont une présentation dont l'agressivité est indépendante du statut mutationnel *IGHV* (76–78). Enfin, les études de NGS semblent montrer la co-existence au niveau individuel de plusieurs sous-clones pouvant présenter un degré de mutation somatique différent (79).

Si le statut mutationnel a une influence indéniable sur le pronostic des patients traités par RFC (avec des survies sans progression [PFS] très prolongées chez les patients *IGHV* muté surtout lorsqu'ils atteignent une MRD négative en fin de traitement), une telle différence n'a pour le moment pas été mise en évidence avec l'ibrutinib (24) (les seules différences actuellement observées concernent la lymphocytose qui semble plus importante et plus prolongée chez les patients *IGHV* mutés (80)). Les cellules de LLC non mutées seraient plus sensibles à l'inhibition du BCR que les cellules de LLC mutées, expliquant l'absence de valeur pronostique de ce statut chez les patients traités par inhibiteurs du BCR (81). Il a récemment été suggéré que les mutations présentes dans les deux types de LLC étaient différentes, expliquant leur différence en termes de pronostic (82).



**Figure 5 : dualité de la LLC selon le statut mutationnel *IGHV*. *IGHV-UM* CLL pour LLC non mutée *IGHV*. *IGHV-M* CLL pour LLC mutée *IGHV*. D'après (60).**

### 1.3 Diagnostic et pronostic

#### 1.3.1 LLC et lymphocytose B monoclonale

Dans la plupart des cas, le diagnostic est évoqué devant la présence d'une hyperlymphocytose découverte fortuitement sur un bilan biologique. Les signes spécifiques pouvant amener à faire un hémogramme sont la présence d'un syndrome tumoral, de signes généraux, d'infections faisant évoquer une hypogammaglobulinémie, ou bien encore en cas de cytopénie auto-immune (essentiellement anémie hémolytique auto-immune).

A l'examen cytologique du frottis sanguin, les cellules de LLC sont de petits lymphocytes matures et monomorphes, de morphologie proche de celle des lymphocytes normaux. Elles présentent un rapport nucléocytoplasmique élevé (> 90 %), un noyau arrondi et sans encoche, une chromatine mature non nucléolée, un cytoplasme bleuté et sans granulation. La présence d'ombres nucléaires dites de Gumprecht est classique – noyaux nus correspondant à des cellules altérées par une apoptose résultant de la réalisation du frottis sanguin ; leur présence est liée à une faible expression de la vimentine et est très évocatrice de LLC. Certaines atypies peuvent parfois être présentes, notamment une chromatine mottée. Un contingent pro-lymphocytaire peut s'observer d'emblée ou au cours de l'évolution de la maladie. En présence de plus de 55 % de pro-lymphocytes circulants, on parle de leucémie pro-lymphocytaire B (B-PLL).

Les critères diagnostiques de la LLC ont été révisés en 2008 par l'IWCLL, et il est nécessaire d'avoir au moins 5000 lymphocytes clonaux par  $\text{mm}^3$  ayant un score de Matutes à au moins 4/5 et depuis plus de 3 mois pour porter ce diagnostic.

Le caractère clonal de la prolifération est affirmé par une monotypie kappa ou lambda. La LLC présente certaines caractéristiques immunophénotypiques. On y retrouve une faible expression de l'immunoglobuline de surface. On retrouve par ailleurs l'expression du CD5, marqueur T également exprimé dans les LCM et dans environ la moitié des B-PLL. On retrouve également une expression du marqueur d'activation CD23, ainsi qu'une diminution de l'expression de FMC7 et de CD79b. Outre ces éléments permettant le calcul du score de Matutes, il est à noter d'autres particularités phénotypiques des cellules de LLC : faible expression membranaire de CD20 et de CD22, absence d'expression de CD10, expression de ROR1 et de CD200, possibilité d'expression de CD25, CD38, CD43, CD200, CD71, CD11c. En cas de score de Matutes à 3/5, l'expression de CD43, de ROR1 et de CD200 est évocatrice de LLC (mais les patients sont généralement exclus des essais cliniques si le score de Matutes n'est pas d'au moins 4/5).

Le lymphome lymphocytaire partage les mêmes caractéristiques physiopathologiques et évolutives que la LLC, si bien que ces deux maladies sont regroupées au sein d'une même entité nosologique (2,3).

En cas de lymphocytose clonale chronique de Matutes à au moins 4/5 mais inférieure à 5 G/L et asymptomatique (sans syndrome tumoral et sans cytopénie par infiltration médullaire), on parle de lymphocytose B monoclonale (LBM). En l'absence de LLC mais avec un syndrome tumoral significatif, on parle de lymphome lymphocytaire.

La LLC est constamment précédée par une phase de lymphocytose B monoclonale (LBM) faite de lymphocytes clonaux présentant un phénotype de LLC, mais insuffisamment nombreux pour faire porter ce diagnostic (on parle de LLC lorsqu'il existe plus de 5000 lymphocytes B clonaux par  $\text{mm}^3$ , et/ou lorsqu'il existe une cytopénie liée à la prolifération lymphoïde). Le potentiel d'une LBM à évoluer vers une LLC est estimé à 1 % par an et concerne essentiellement les sujets ayant plus de 500 lymphocytes clonaux par  $\text{mm}^3$  : il s'agit des LBM high count, dont le répertoire *IGHV* est similaire à celui des LLC, contrairement aux LBM low count comprenant moins de 500 lymphocytes clonaux par  $\text{mm}^3$  (83,84), dont le répertoire *IGHV* est différent et qui concernent 5 % des personnes d'origine européenne ayant plus de 40 ans.

La biopsie ostéomédullaire, de pratique courante aux Etats-Unis ou en Australie, n'est pas pratiquée en routine en Europe pour cette maladie. Si une biopsie ganglionnaire est pratiquée (essentiellement en cas de lymphome lymphocytaire), elle retrouve un aspect d'infiltration diffuse par de petits lymphocytes matures avec des centres prolifératifs (pseudo-follicules).

### 1.3.2 Pronostic

Le pronostic de la LLC est très hétérogène : alors que certains patients vont nécessiter une intervention thérapeutique dès le diagnostic (avec parfois des maladies réfractaires à tout traitement), d'autres ne seront jamais traités et décéderont de causes indépendantes.

De nombreux facteurs pronostiques ont été décrits, mais ont rarement été testés dans des modèles multivariés. Une méta-analyse récente combinant les données de 8 essais cliniques prospectifs randomisés utilisant de la chimiothérapie ou de l'immunochimiothérapie (ICT) en première ligne a permis d'identifier la valeur pronostique indépendante de 5 facteurs en termes de survie globale (OS) : l'âge, le stade clinique, la  $\beta$ 2-microglobuline, le statut

mutationnel *IGHV* et la délétion et/ou mutation de *TP53* (72). D'autres scores ont été élaborés à visée pronostique dans la LLC, dont la principale limite est l'analyse de données de patients traités exclusivement par chimiothérapie ou ICT et l'absence d'intégration des données récentes (biologie moléculaire, subsets).

La société française d'hématologie recommande la détection en pré-thérapeutique de del17p et del11q. La recherche d'une délétion 17p doit systématiquement être assortie d'une recherche de mutation de *TP53* car ces deux anomalies ont une valeur pronostique identique, et ce quelle que soit la taille du clone muté/déléte (85).

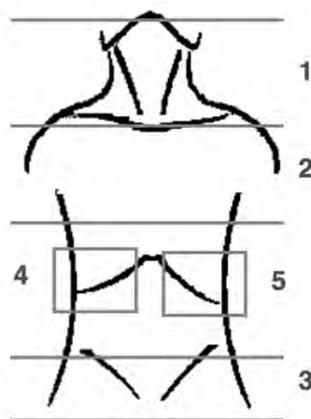
### 1.3.2.1 Facteurs pronostiques cliniques

L'âge est prédictif de survie globale de manière indépendante, avec un seuil à 65 ans dans le score CLL-IPI.

Des stades ayant un rôle pronostique mais également utilisés pour guider les indications thérapeutiques sont définis dans cette maladie ; il s'agit de la classification de Binet et de la classification Rai, utilisées en Europe et aux Etats-Unis respectivement (Figure 6, Tableau 1, Tableau 2). Ces deux classifications se basent sur la présence et l'importance du syndrome tumoral ainsi que sur la présence de cytopénies (indépendamment de leur mécanisme). Ces deux scores anciens (la classification de Binet a été élaborée en France dans les années 1980 sur moins de 100 malades) restent d'actualité en prédiction de survie (72,86,87).

**Tableau 1 : classification de Binet**

Stade	Description
Stade A	<3 aires ganglionnaires atteintes Hb $\geq$ 10 g/dL et plaquettes $\geq$ 100 G/L
Stade B	$\geq$ 3 aires ganglionnaires atteintes Hb $\geq$ 10 g/dL et plaquettes $\geq$ 100 G/L
Stade C	Hb < 10 g/dL et/ou plaquettes < 100 G/L



**Figure 6 : aires ganglionnaires de la classification de Binet**

**Tableau 2 : classification de Rai, d'après (88)**

Stade	Description	Pronostic
<b>0</b>	Forme médullo-sanguine pure	Favorable
<b>I</b>	Stade 0 avec adénopathie(s)	Favorable
<b>II</b>	Stade 0/I avec hépatomégalie et/ou splénomégalie	Intermédiaire
<b>III</b>	Lymphocytose et anémie < 11 g/dL	Défavorable
<b>IV</b>	Lymphocytose et thrombopénie < 100 G/L	Défavorable

#### 1.3.2.2 Facteurs pronostiques biologiques

La  $\beta$ 2-microglobuline, reflet de la masse tumorale, a la plus grande valeur avec un poids pronostique indépendant en survie globale dans le score CLL-IPI (seuil à 3,5 mg/L). Elle a également une valeur pronostique indépendante avec deux seuils dans le score développé par le groupe allemand sur des patients traités par chimiothérapie +/- anti-CD20 en première ligne.

La valeur sérique de thymidine-kinase, bien que rarement pratiquée en routine, a une valeur pronostique indépendante après traitement de première ligne par chimiothérapie ou ICT. Associée à d'autres facteurs, elle a également un pouvoir discriminant pour identifier les patients stade A qui nécessiteront un traitement (87,89).

En cytométrie en flux, l'expression membranaire de CD38 et de CD49d ainsi que l'expression cytoplasmique de ZAP70 sont également pronostiques.

#### 1.3.2.3 Facteurs pronostiques génétiques

La présence d'une homologie d'au moins 98 % du gène *IGHV* avec la lignée germinale est un facteur pronostique indépendant en prédiction de temps jusqu'à premier traitement (90), ainsi qu'en termes de survie globale et sans progression après chimiothérapie/ICT (72,87). Sous ibrutinib, le statut *IGHV* perd sa valeur pronostique.

La présence de subsets de BCR permet l'identification de groupes pronostiques, mais ces subsets n'ont pas été intégrés dans des modèles multivariés alors qu'il a pu être démontré que l'acquisition de mutations pronostiques pouvait être guidées par l'appartenance à des subsets particuliers (73).

Des groupes pronostiques peuvent être définis par l'identification de plusieurs anomalies en FISH : délétion 17p, délétion 11q, trisomie 12, délétion 13q isolée (12).

L'anomalie ayant la signification pronostique la plus forte est la délétion 17p (et/ou mutation inactivatrice de *TP53*), qui est retrouvée indépendante en termes de prédiction de temps jusqu'au premier traitement, de survie globale et de survie sans progression après de la chimiothérapie ou de l'ICT. Les inhibiteurs du BCR et de *BCL2* ont montré une activité intéressante dans les maladies présentant ce type d'anomalies (24,80,91,92), mais leur pronostic demeure moins bon. La valeur pronostique de cette anomalie est indépendante de la taille du clone muté/déléte (18,35,36).

La délétion 11q a une signification pronostique d'autant plus importante qu'elle est bi-allélique, et est prédictive de temps jusqu'au premier traitement et de la survie sans progression. Elle gardait une signification pronostique indépendante dans le score développé par le groupe allemand, mais sa valeur disparaissait dans l'analyse multivariée concernant l'OS dans le score CLL-IPI. Sous ibrutinib, la del11q perd sa valeur pronostique péjorative.

La valeur pronostique péjorative d'un caryotype complexe est importante avec l'ICT et elle le reste sous ibrutinib, pour évaluer le temps jusqu'au premier traitement et l'OS (23).

De nombreuses mutations récurrentes ont un impact pronostique indépendant du statut *IGHV*, et permettent l'amélioration de la prédiction pronostique lorsqu'elles sont ajoutées aux données de cytogénétique (93–95). Outre *TP53*, on note essentiellement la valeur pronostique péjorative des mutations de *BIRC3*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *ERG2* ainsi que l'impact pronostique très défavorable de l'association des mutations de *TP53*, *ATM* et *SF3B1* (32).

#### 1.3.2.4 Réponse au traitement

Après ICT, le niveau de MRD et le niveau de réponse atteint sont des paramètres prédictifs d'OS en analyse multivariée (96). De plus, une rechute précoce (dans les 24 à 36 mois) après immunochimiothérapie type RFC est prédictive d'une moins bonne survie globale (97), justifiant le changement de modalités thérapeutiques (passage à un inhibiteur du BCR ou de BCL2).

#### 1.3.2.5 Le score CLL-IPI (Tableau 3, Tableau 4)

Ce score a été élaboré en intégrant 27 variables chez 3472 patients traités en Europe ; deux cohortes de Scandinavie et des Etats-Unis comprenant respectivement 416 et 838 patients ont servi à la validation externe du score. Il permet la classification des patients en quatre groupes pronostiques différents en termes de survie globale à 5 et à 10 ans.

**Tableau 3 : poids pronostique des variables du score CLL-IPI**

Variable	Valeur adverse	Valeur CLL-IPI
<b><i>TP53</i></b>	Déléteé ou muté	4
<b><i>IGHV</i></b>	Non muté	2
<b><math>\beta</math>2-microglobuline</b>	> 3,5 mg/L	2
<b>Stade clinique</b>	Binet B ou C RAI I à IV	1
<b>Age</b>	> 65 ans	1

**Tableau 4 : groupes pronostiques définis par le score CLL-IPI**

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

## 1.4 Complications de la LLC

### 1.4.1 Infections

De nombreux défauts du système immunitaire ont été constatés dans la LLC, au premier rang desquels l'hypogammaglobulinémie, responsable classiquement d'infections à répétition à tropisme bronchique ou sinusien et répondant à une supplémentation par immunoglobulines polyvalentes durant la période hivernale (98).

Les infections sont la principale cause de décès dans la LLC, et étaient son mode de révélation le plus fréquent lorsque les bilans biologiques étaient pratiqués de manière moins routinière. Les plus souvent observées chez les patients non traités sont des infections bactériennes à tropisme respiratoires, essentiellement à *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* ; des infections urinaires à *Escherichia coli* sont classiquement rapportées. Les infections à *Herpesviridae* sont également fréquemment observées notamment les zozonas, mais plutôt après initiation du traitement de la LLC. En effet, les différents traitements de la LLC (notamment les analogues des purines) aggravent le déficit immunitaire, ce qui justifie l'utilisation systématique d'une prophylaxie anti-Alphaherpesviridae et anti-*Pneumocystis* jusqu'à 6 mois après fin de l'ICT.

### 1.4.2 Manifestations auto-immunes

Il s'agit essentiellement des cytopénies auto-immunes, au premier rang desquelles on retrouve l'anémie hémolytique auto-immune dont la prévalence est estimée entre 2,3 et 7,7% des patients selon les études, suivie des thrombopénies immunologiques (2 % des patients environ) et enfin de l'érythroblastopénie auto-immune (1 % des patients). L'existence d'une neutropénie auto-immune satellite de la LLC reste controversée.

Des manifestations auto-immunes extra-hématologiques sont également décrites mais uniquement par rapports de cas, si bien qu'il est impossible d'en évaluer l'incidence ; de plus, la nature auto-immune de ces manifestations n'est pas toujours formellement établie. Citons le pemphigus, les glomérulonéphrites membranoprolifératives et l'angio-œdème acquis.

### 1.4.3 Seconds cancers

Si le lien entre LLC et seconds cancers est connu de longue date et attribué à l'immunosuppression liée à la maladie, il est intrigant de constater que le spectre de cancers associés à la LLC n'est pas semblable à ce qui est observé dans les autres déficits immunitaires. Le sur-risque de cancer secondaire ne semble pas augmenté après un traitement de première ligne (99,100). Le risque de syndrome myélodysplasique et de leucémie aiguë myéloïde après une ICT contenant un analogue des purines est de l'ordre de 5 % (soit supérieur à celui de la population générale) et est augmenté par la réalisation d'une autogreffe de CSH (101). Le pronostic de ces LAM et MDS est sombre (102,103).

### 1.4.4 Transformation pro-lymphocytaire

Cette évolution est rare (< 1 %) et se manifeste par une splénomégalie importante et une augmentation rapide des leucocytes (dont les pro-lymphocytes représentent au moins 55 % par définition). Son traitement fait appel à une immunochimiothérapie ou bien à des inhibiteurs du BCR.

#### 1.4.5 Syndrome de Richter

Le syndrome de Richter (SR), correspond à la transformation de la LLC en pathologie lymphoïde agressive de type lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) ou bien plus rarement lymphome de Hodgkin (104). Le SR est peu fréquent (prévalence de 2 à 8 % des LLC, incidence estimée à 0,5 % par an pour les LBDGC et 0,05 % par an pour les Hodgkin). Son délai médian de survenue depuis le diagnostic est de 1,8 à 5 ans selon les études (105) pour les LBDGC (peut être présent au diagnostic), plus long de l'ordre de 6 ans pour les Hodgkin (apparaît essentiellement chez des patients ayant déjà été traités).

Les signes faisant évoquer ce type de complication sont les signes B, la croissance rapide et asymétrique du syndrome tumoral, l'élévation des LDH, ainsi que la présence d'un envahissement extra-nodal. Si l'examen anatomopathologique d'une pièce biopsique en permet le diagnostic, le PET-scanner peut fournir des arguments en faveur d'un SR lorsque le seuil de SUVmax dépasse 10 (106), voire 5 dans certaines études. Cet examen est particulièrement intéressant dans la LLC, maladie à faible avidité pour le FDG en situation non évolutive (107,108), car il permet de guider le site de biopsie pour documentation histologique en cas de suspicion de SR.

Il faut noter que 10 à 20 % des SR de type LBDGC (et 50-60 % des Richter de type Hodgkin) ne sont pas reliés au clone de LLC (réarrangement *IGHV* différent), et présentent alors un pronostic moins péjoratif que lorsqu'ils se développent à partir du clone de LLC.

Les différents facteurs de risque actuellement identifiés ne concernent que la transformation en LBDGC et sont les suivants :

- Au niveau clinique : la présence d'un syndrome tumoral important de plus de 3 cm (risque multiplié par 10) et le stade avancé (RAI III ou IV) sont associés à des SR plus fréquents, alors que d'autres facteurs de risque cliniques d'évolutivité de la LLC comme LDH,  $\beta$ 2-microglobuline, et temps de doublement lymphocytaire n'ont pas démontré d'association avec un risque accru de développer un SR (ce qui suppose deux modes d'évolution distincts).
- Au niveau biologique : certains polymorphismes de *BCL2*, de *CD38* et de *LRP4*, la présence d'une mutation de *NOTCH1*, l'absence de mutation *IGHV* (risque multiplié par 4) et la présence d'un BCR stéréotypé (et particulièrement du subset 8 avec un risque multiplié par 17) sont associés au SR. La brièveté des télomères, témoin de l'instabilité génétique, est également associée à un risque accru de SR. Les études de WGS mettent en exergue l'importance de l'altération de la voie *TP53* (60 % des SR présentent une délétion 17p et/ou une mutation *TP53*) et de *CDKN2A*, de la mutation *NOTCH1* (surtout en présence d'une trisomie 12, association mutuellement exclusive avec les altérations de *TP53* et de *CDKN2A*) et de l'activation de *MYC* ; ces quatre anomalies regroupées concernent 90 % des SR.
- Au niveau thérapeutique, le traitement par analogues des purines a été suspecté d'augmenter le risque de SR, particulièrement lorsqu'il était associé à des alkylants (les seconds induisant des dommages à l'ADN dont la réparation serait rendue moins efficace par les premiers) ; ceci est actuellement remis en question. Il en est de même pour l'ibrutinib, suspecté d'augmenter le risque de SR, hypothèse réfutée depuis quelques années (ce médicament sélectionnant en fait un clone résistant qui préexistait à sa mise en place). Enfin l'alemtuzumab, de par la profonde lymphopénie qu'il induisait, a fait surgir des lymphoproliférations à EBV qui n'étaient pas reliées à la LLC en elle-même (exceptionnels réarrangements *IGHV* communs).

On note que dans les SR type LBDGC apparentés au clone de LLC, 70 % sont l'évolution terminale de ce clone (évolution clonale linéaire), alors que 30 % sont le fruit d'une évolution clonale branchée à partir d'un précurseur commun. Il faut également noter que les SR présentent des particularités par rapport aux LBDGC *de novo*, notamment en termes de sous-type histologique (les SR étant non-GC de manière quasi-constante) ou d'anomalies géniques (moindre fréquence des réarrangements de BCL6, par exemple (109)).

Il n'y a actuellement pas de standard de prise en charge, et les patients bénéficient souvent d'une ICT consolidée par une greffe de cellules souches autologues ou allogéniques en cas de réponse. Leur pronostic demeure très sombre, surtout en cas de SR relié à la LLC. Les inhibiteurs de checkpoint tels que les anti-PD1 pourraient constituer une perspective intéressante dans cette maladie (110).

## 1.5 Prise en charge thérapeutique

### 1.5.1 Indications thérapeutiques

Une indication thérapeutique est posée en cas de cytopénie liée à la LLC (que son mécanisme soit infiltratif ou immunologique), de syndrome tumoral important et gênant, ou en cas de signes de maladie active.

Les indications thérapeutiques sont donc les suivantes (2) :

- Signes généraux sans signe d'infection
  - Sueurs nocturnes depuis plus d'un mois
  - Perte de d'au moins 10 % du poids corporel dans les 6 mois
  - Fièvre au-delà de 38°C depuis plus de deux semaines
- Stade C de Binet
  - Hb < 10 g/dL
  - Plaquettes < 100 G/L
- Signes de maladie active sur la lymphocytose (en l'absence d'infection récente et au-delà de 30 G/L)
  - Temps de doublement de lymphocytose inférieur à 6 mois
  - Lymphocytose augmentant d'au moins 50 % en 2 mois
- Splénomégalie de plus de 6 cm de débord sous-costal, ou symptomatique
- Syndrome tumoral important (>10 cm), compressif et/ou menaçant

### 1.5.2 Outils thérapeutiques

#### 1.5.2.1 Immunochimiothérapie

Après l'utilisation large du chloraminophène (Clb), d'autres médicaments ont fait leur apparition, tels que les analogues de purine et les alkylants. L'adjonction d'une immunothérapie par anti-CD20 ou anti-CD52 a permis d'approfondir le taux de réponse et les intervalles libres de traitement pour cette pathologie incurable en l'absence d'allogreffe. Les différentes associations et leurs résultats en termes de taux de réponse et d'obtention de maladie résiduelle indétectable figurent dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : historique des associations de chimiothérapie/ICT avec leurs résultats**

Type d'approche	Exemple	Réponse globale	Réponse complète	MRD < 10 <sup>-4</sup>	Durée de rémission
<b>Alkylants</b>	Chlorambucil	40-60 %	< 10 %	Non attendue	1 à 2 ans
<b>Analogues des purines</b>	Fludarabine	60-80 %	8-20 %	Rare (< 15 %)	1,5 à 3 ans
<b>Analogues + alkylants</b>	FC	80-90 %	25-35 %	15-25 %	3 à 4 ans
<b>Anticorps monoclonaux</b>	Alemtuzumab	80 %	20-25 %	7 %	1,5 ans
<b>Analogues + alkylants + anticorps</b>	RFC	95 %	50 %	> 50 %	> 4 ans

Du fait des taux de réponse importants apportés par cette association et de la possibilité de rémissions prolongées dans des sous-groupes particuliers de patients, le RFC est l'ICT de première ligne chez les patients jeunes et en suffisamment bon état général (toxicité hématologique non négligeable et nécessité d'une fonction rénale préservée pour l'administration de fludarabine). Il est intéressant de noter que la qualité de vie des patients atteints de LLC traités par RFC ou FC n'est pas altérée de manière différente dans l'essai CLL8 (111). De plus, le RFC a maintenant montré la possibilité de rémissions prolongées chez les patients *IGHV* mutés sans facteur cytogénétique adverse, dont l'OS devient superposable à celle de la population générale appariée sur l'âge et le genre (*IGHV* muté sans del11q ni del17p (112)). Il a également été constaté une phase de plateau dans les courbes de PFS des patients *IGHV* mutés issus de l'essai de phase II du MDACC testant le RFC en première ligne, avec une PFS de 53,9 % à 12,8 ans (79,8 % en cas de MRD médullaire < 10<sup>-4</sup> à l'issue du RFC, ce qui concerne plus de la moitié de ces patients) (113). La comparaison du RFC à l'association de Rituximab et de Bendamustine en première ligne de LLC a montré que la PFS était meilleure pour les patients les plus jeunes avec le RFC, et un plateau de PFS n'a pas été observé avec R-Bendamustine (114,115).

Chez les patients plus âgés et/ou présentant des comorbidités contre-indiquant l'utilisation du RFC, plusieurs protocoles d'ICT sont disponibles. La bendamustine est intéressante car elle est un nouvel alkylant, et le schéma R-Bendamustine limite les effets secondaires de type neutropénie fébrile/infections par rapport au RFC chez les patients âgés (114). L'association Obinutuzumab et Chlorambucil a été testée en première ligne chez des patients présentant des comorbidités importantes (essai CLL11) ; elle a démontré une efficacité supérieure au Clb seul ou avec du Rituximab, avec des MRD négatives chez plus de 35 % des patients, une PFS médiane de 26,7 mois et un temps libre de traitement de 51 mois en médiane, ce qui doit faire préférer ce traitement en cas de comorbidité significative (116,117).

#### 1.5.2.2 Inhibiteurs du BCR

La signalisation par le BCR est importante pour la survie des cellules de LLC, expliquant le développement de molécules ciblant cette voie (45).

Une caractéristique de ces traitements est d'induire une diminution rapide du syndrome tumoral concomitante d'une lymphocytose pouvant persister plusieurs mois et ayant fait introduire la notion de réponse partielle avec lymphocytose. Cette recirculation des

lymphocytes depuis les centres prolifératifs vers le sang serait due à une diminution de l'expression membranaire de CXCR4 après inhibition du BCR (118).

**L'ibrutinib** a été le premier inhibiteur du BCR utilisé sur de grands effectifs dans la LLC, sur une population de 101 patients lourdement prétraités (médiane de 4 lignes antérieures). Nous avons maintenant un recul de 5 ans sur ces patients, qui obtiennent sous ibrutinib des PFS médianes de 26 mois en cas de délétion 17p, 55 mois en cas de del11q et 33 mois en cas de caryotype complexe. La PFS médiane sur l'ensemble de la population est de 52 mois (24). Ainsi la population de la phase Ib/II a été implémentée de 31 patients de plus de 65 ans non préalablement traités, pour lesquels le suivi à 5 ans retrouve une PFS de 92 %, avec 35 % d'arrêt de traitement, essentiellement pour des raisons de tolérance.

Cette efficacité importante et la supériorité de l'ibrutinib sur l'ofatumumab (essai RESONATE (119)) ont rapidement fait tester ce médicament en première ligne. La randomisation entre ibrutinib et chlorambucil en première ligne chez des sujets de plus de 65 ans sans del17p (essai RESONATE-2 (120)) a montré une PFS de 89 % à 2 ans et une supériorité de l'ibrutinib par rapport au Chlorambucil. Cependant ces deux études s'intéressaient à des patients présentant peu de comorbidités malgré un âge de plus de 65 ans, notamment dans l'essai RESONATE-2 (seulement 31 % de comorbidités significatives et un statut *IGHV* majoritairement muté) qui utilisait par ailleurs un bras comparateur notoirement inefficace.

De nouvelles questions se posent également avec l'ibrutinib, notamment son coût (médicament à prendre en continu jusqu'à progression), ses effets secondaires, ses interactions médicamenteuses, sa dépendance à l'observance du patient (121). Les arrêts de traitement avec ce médicament sont en effet rarement dus à une progression de la maladie, mais surtout à des effets indésirables (122,123).

La toxicité de l'ibrutinib est en effet de mieux en mieux connue, et les études en vie réelle semblent montrer davantage d'effets indésirables que dans les essais cliniques (124,125).

**L'Idélalisib** est un inhibiteur de l'isoforme  $\delta$  de PI3K, dont l'expression est restreinte aux cellules de la lignée hématopoïétique et qui est activée de manière constitutive dans la LLC. Après une phase I retrouvant un taux de réponse globale de plus de 70 % chez des malades lourdement prétraités (126), l'idélalisib a rapidement été testé en combinaison au rituximab. L'enregistrement de cette association a été permis par un essai randomisant les patients en double aveugle entre les associations R-Idélalisib et R-placebo. Sans surprise avec un tel bras comparateur, l'association comprenant l'idélalisib a été montrée supérieure avec 92 % d'OS à 12 mois contre 80 % dans le bras R-placebo. Ce médicament a cependant été responsable de nombreuses infections opportunistes notamment des maladies à CMV et des pneumocystoses.

**Ces deux médicaments** ont une activité plus importante que celle de l'ICT sur les maladies présentant une del17p : ainsi dans une étude de phase 2 s'intéressant à l'ibrutinib chez des patients ayant une délétion 17p, il a été retrouvé une PFS à deux ans de 82 %, sans différence entre les patients recevant l'ibrutinib en situation de première ligne ou de rechute/réfractaire. Dans une autre étude de phase 2 s'intéressant à des patients âgés naïfs de traitement et recevant l'association Rituximab et Idélalisib en première ligne, il a été retrouvé une PFS de 82 % à deux ans, sans différence selon que les patients avaient ou non une délétion 17p (80,92).

**D'autres médicaments** sont en cours de développement, les plus avancés étant l'acalabrutinib, le tirabrutinib (inhibiteurs de BTK) et le duvelisib (inhibiteur de PI3K isoformes  $\delta$  et  $\gamma$ ).

#### 1.5.2.3 Inhibiteurs de BCL2

Une autre perspective intéressante dans la LLC est l'inhibition de la voie BCL2. Le Venetoclax est un médicament ayant induit un syndrome de lyse tumorale en 24 heures chez 3 patients porteurs de LLC après administration d'une dose unique, et qui épargne les plaquettes (lui évitant la toxicité limitante du navitoclax (127)). L'étude de phase I du venetoclax a permis d'obtenir chez des malades lourdement prétraités plus de 70 % de réponse globale dont 20% de RC et 5 % de MRD médullaires indétectables (91). Une autre étude s'est intéressée spécifiquement aux patients en rechute et/ou réfractaires et présentant une del17p, avec 79,4 % de réponse globale (128).

#### 1.5.2.4 Autres traitements

**Le lenalidomide** est un IMiD qui a une activité dans les syndromes myélodysplasiques, le myélome et certaines lymphopathies. Dans la LLC, il est responsable d'un effet « flare » initial chez un peu plus de la moitié des patients. Une étude monocentrique menée au MDACC a retrouvé 58 % de répondeurs longs (> 36 mois), qui normalisaient leur nombre de CD4 dans 48 % des cas (129). L'adjonction de rituximab au lenalidomide a été responsable de neutropénies de grades 3 et 4 très fréquentes dans une population en rechute et/ou réfractaire (130). Son association à RF ou à RB s'est avérée très neutropénisante et l'avenir de ce médicament dans la LLC réside probablement dans son utilisation en maintenance : dans une population en RC après 4 cures d'ICT avec MRD détectable et un statut *IGHV* non muté ou une délétion de *TP53*, la randomisation entre placebo et lenalidomide a permis de montrer un avantage significatif en faveur du lenalidomide avec des négativations de MRD et une PFS médiane non atteinte dans le bras lenalidomide contre 13,3 mois dans le bras placebo (131).

**Le pembrolizumab** apparaît être une option intéressante dans les SR, avec 44 % de réponse globale dans un essai récemment publié (110).

**Les CAR T-cells** sont une thérapie sur laquelle de nombreux espoirs reposent en hématologie maligne. La LLC ne fait pas exception, et des CAR autologues anti-CD19 comprenant CD137 et CD3 $\xi$  ont été testés avec succès dans cette maladie (132). Les difficultés techniques inhérentes à leur fabrication constituent néanmoins un frein majeur, d'autant que de nombreuses nouvelles molécules voient actuellement le jour dans la LLC.

#### 1.5.2.5 Associations thérapeutiques

Après l'association des chimiothérapies avec les anticorps monoclonaux, les associations d'avenir combineront vraisemblablement des ICT et des inhibiteurs du BCR ou de BCL2. Les études en cours sont nombreuses, et certaines ont déjà des résultats disponibles.

**L'étude HELIOS** a randomisé en double aveugle des patients en rechute et/ou réfractaires après ICT et n'ayant pas de délétion 17p entre RB-Ibrutinib et RB-placebo. A 18 mois, l'association triple permet une PFS de 79 % contre 24 % seulement avec RB ( $p < 0,0001$ ). Cependant la comparaison indirecte de ces résultats avec ceux de l'étude RESONATE (après exclusion des patients présentant une del17p et ajustement sur les principaux facteurs

pronostiques dont le nombre de lignes de traitement antérieures) semble montrer que RB-ibrutinib n'améliore pas les résultats de l'ibrutinib en monothérapie dans le même type de situation (133,134).

**L'étude TUGELA** a randomisé des patients en rechute et/ou réfractaires dont de nombreux patients avec del17p entre RB-idélalisib et RB-placebo. L'association triple permet une PFS médiane de 23,1 mois contre 11,1 mois seulement pour RB ( $p < 0,0001$ ). Il existe également un avantage en OS, mais les infections sévères sont très fréquentes dans le bras comprenant l'idélalisib (135).

**L'association RFC-Ibrutinib** a été testée en première ligne de LLC chez 35 patients jeunes (65 ans ou moins), avec d'excellents résultats en termes de MRD (89 % de MRD médullaires négatives). Le suivi est pour le moment d'à peine un an (136).

**L'association de venetoclax à un anti-CD20** est prometteuse en termes d'obtention de MRD négative, et a même permis dans certains cas avec R-venetoclax l'arrêt du traitement sans rechute de la maladie (137). Une publication de résultats très préliminaires de l'essai CLL14 a permis de retrouver 11 MRD négatives sur 12 patients âgés et/ou présentant des comorbidités significatives traités par cette association en première ligne (138). L'essai BAG du groupe allemand testera cette association après une injection de bendamustine permettant de diminuer la masse tumorale (évitant le syndrome de lyse tumorale).

Des traitements adaptés à l'évolution en cours se développent également, par exemple l'essai français GA-I adapte le traitement des patients selon leur réponse à 9 mois de traitement à base d'ibrutinib et d'obinutuzumab.

### 1.5.3 Surveillance après traitement

La surveillance est clinique et biologique, et les critères de traitement d'un patient en rechute sont les mêmes que pour un patient naïf de traitement.

### 1.5.4 Stratégie thérapeutique

Chez les patients jeunes sans del17p ni insuffisance rénale, le traitement doit être du RFC, *a fortiori* en présence d'une mutation *IGHV*.

Chez les patients présentant une del17p, le traitement doit passer par de l'ibrutinib, du venetoclax (si contre-indication à l'ibrutinib) ou par un essai clinique.

En-dehors de ces deux cas de figure, la stratégie thérapeutique à adopter n'est pas consensuelle et doit tenir compte de l'âge et des comorbidités du patient.

Chez les patients âgés, le choix en première ligne doit se faire entre l'association Obinutuzumab et Chloraminophène d'une part et Ibrutinib (monothérapie) d'autre part ; les arguments pour préférer l'ibrutinib sont une del11q et un statut *IGHV* non muté. Les comorbidités cardiovasculaires (notamment troubles du rythme) doivent faire préférer l'association obinutuzumab-clb.

Les stratégies thérapeutiques en rechute sont encore moins bien codifiées. En cas de rémission de plus de 36 mois après une ICT, le traitement initial peut être répété.

Quoi qu'il en soit, le coût de prise en charge de la LLC a été bouleversé par les nouvelles thérapies orales ciblées dont l'avenir réside probablement dans leur association à des chimiothérapies, ou dans leur utilisation en maintenance (121).

## 1.6 Maladie résiduelle dans la LLC

Au décours du traitement de la LLC par immunochimiothérapie (ICT), l'évaluation de la réponse est faite en routine sur la base de l'examen clinique et de l'hémogramme. Un patient est dit en réponse partielle lorsqu'il persiste des signes de la maladie, qu'ils soient cliniques ou biologiques.

En cas de persistance de cytopénies malgré l'absence de signe de maladie, le patient est dit en réponse complète avec reconstitution hématologique incomplète (RCi). Les chimiothérapies induisant des cytopénies et les anticorps anti-CD20 des neutropénies, il est recommandé d'attendre au moins 2 mois après la fin de l'ICT pour évaluer la réponse (2).

La LLC étant une maladie incurable en l'absence d'allogreffe de cellules souches, le pronostic des formes nécessitant un traitement est conditionné par les toxicités des chimiothérapies et le temps libre de traitement par la suite. Sur la base des critères habituels de réponse au traitement, il a été démontré qu'une meilleure réponse à un traitement était associée à un temps sans progression (PFS pour progression free survival) et à une survie plus longs (OS pour overall survival).

### 1.6.1 Rationnel pour la mesure de la MRD dans la LLC

Suite à un traitement cytotoxique dans la LLC, le nombre de cellules leucémiques d'un patient diminue et plus le nombre de cellules résiduelles est élevé, plus la rechute de la maladie sera précoce. Le terme maladie résiduelle (MRD pour minimal residual disease) désigne la détection (plus ou moins associée à la quantification) de la maladie persistante après traitement cytotoxique, avec une meilleure sensibilité qu'une évaluation selon les critères IWCLL 2008 (sensibilité estimée 1000 fois supérieure) ; cependant il persiste des cellules leucémiques en-deçà du seuil de détection des différentes méthodes de MRD puisque des rechutes sont constatées à long terme chez les patients ayant une MRD négative. La MRD est fortement corrélée à la survie globale ainsi qu'à la survie sans progression, raison pour laquelle elle est acceptée comme marqueur de substitution.

La Figure 7 schématise l'utilité de la MRD dans différentes situations.

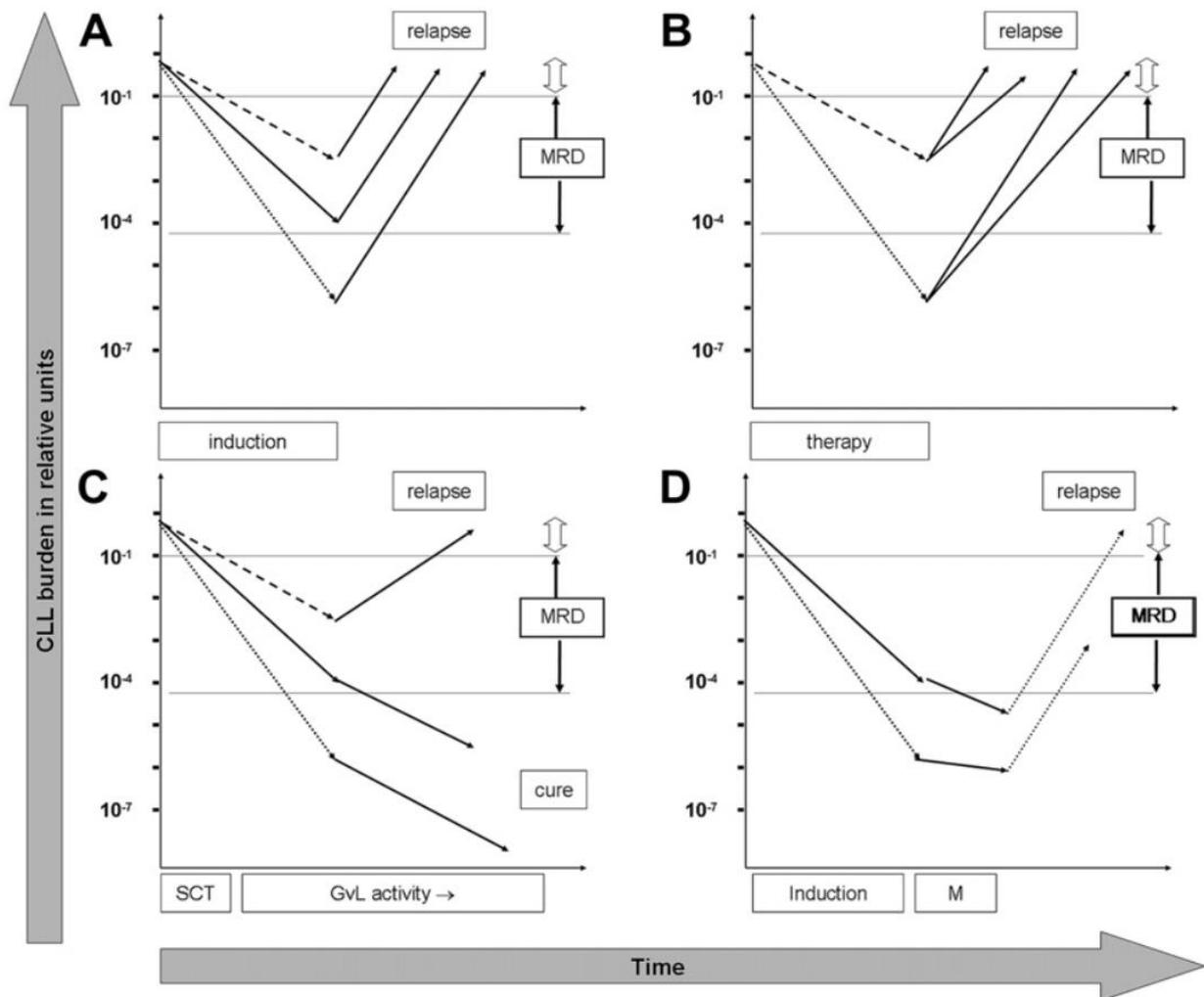


Figure 7 : utilité de la MRD dans différentes situations. (A) : la MRD permet après ICT une meilleure prédiction de la PFS que les simples critères cliniques. (B) : rôle pronostique de la croissance de la MRD dans la prédiction de la PFS. (C) : intérêt de la MRD dans la surveillance de l'effet GvL après allogreffe pour LLC. (D) : rôle potentiel de la MRD pour guider les indications de traitement de maintenance. D'après (139).

### 1.6.2 Méthodes de détection de la MRD

Deux méthodes sont actuellement standardisées et considérées équivalentes pour la détection de la MRD, avec un seuil de détection d'une cellule leucémique sur 10 000 leucocytes (sensibilité de  $10^{-4}$ ) (2,140).

Le Tableau 6 récapitule les différentes méthodes disponibles pour la détection de la MRD.

**Tableau 6 : différentes méthodes de mesure de la MRD**

Méthode	Sensibilité	Quantitatif (seuil)	Standardisé	Matériel	Facteurs influençant les résultats
<b>CMF CD5/19 κ/λ</b>	$10^{-2}$	Non	Non	Leucocytes vivants (<48h)	Cellules B normales (augmentées si traitement récent)
<b>CMF quantitative 4 couleurs</b>	$10^{-4}$	Oui : $10^{-4}$	Oui	$\geq 10^7$ leucocytes vivants (<48h)	Nombre de leucocytes disponibles (prélèvements paucicellulaires)
<b>CMF quantitative 6 couleurs</b>	$10^{-5}$	Oui : $10^{-5}$	Oui	$\geq 10^7$ leucocytes vivants (<48h)	Nombre de leucocytes disponibles (prélèvements paucicellulaires)
<b>PCR à amorces consensus IGHV</b>	$\cong 10^{-3}$	Non	Oui	$\cong 10^6$ leucocytes totaux	Cellules B normales, type de clone
<b>ASO-PCR temps réel</b>	$10^{-5}$	Oui : $10^{-4}$	Oui	$\cong 10^6$ leucocytes totaux	Clone typé préalablement (région CDR3)
<b>Nested ASO-PCR temps réel</b>	$10^{-6}$	Non	Non	$\cong 10^6$ leucocytes totaux	Clone typé préalablement (région CDR3)
<b>PCR à amorces consensus IGHV + séquençage à haut débit</b>	$10^{-6}$	Oui : $10^{-5}$	Non	1 µg d'ADN initial, 6-60 µg pour le suivi	Défaut d'amplification possible si LLC mutée IGHV

#### 1.6.2.1 Méthodes basées sur de la PCR

Ces méthodes sont basées sur la détection du réarrangement du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline spécifique du clone leucémique.

La méthode la plus simple utilise des amorces consensus s'appariant avec des régions de génome conservées et proches de la région hypervariable CDR3. L'amplification de cellules polyclonales donne lieu à des produits de PCR de longueur variable ; à l'inverse, le clone leucémique produit un seul et même produit, ce qui permet son identification et sa quantification (141). L'inconvénient majeur de cette technique est sa sensibilité variable d'un patient à l'autre (plus sensible lorsque le produit est d'une longueur peu commune (142)).

L'ASO-PCR (allele-specific oligonucleotide PCR) est plus sensible et nécessite la fabrication préalable d'amorces spécifiques de la région CDR3 de chaque patient avant traitement, ce qui limite son utilisation en pratique. De plus, l'affinité de l'amorce pour les cellules polyclonales est variable, rendant nécessaire la détermination des sensibilité et spécificité de la technique pour chaque cas.

Enfin le séquençage à haut débit offre des espoirs en termes de sensibilité : après amplification de toutes les cellules B par PCR à amorces consensus *IGHV*, la détection du réarrangement *IGHV* du patient est possible à des taux très bas en séquençage à haut débit ; cette technique nécessite cependant le séquençage préalable de la région CDR3 de chaque patient.

#### 1.6.2.2 Méthodes basées sur la cytométrie en flux (CMF)

La CMF permet de déterminer l'expression de marqueurs membranaires. Les cellules de LLC présentant un phénotype aberrant par rapport aux lymphocytes B normaux, il est ainsi théoriquement aisé de les détecter. La CMF se base sur l'expression du CD5 par les cellules de LLC, ainsi que sur la monotypie  $\kappa/\lambda$  et l'expression anormalement élevée ou anormalement faible de certains marqueurs (comparativement aux rares cellules B CD5+ normales).

La méthode la plus simple – qui est pratiquement abandonnée – consistait à quantifier les cellules B (CD19+ ou CD20+) co-exprimant le marqueur T CD5 et présentant une monotypie  $\kappa/\lambda$ . Sa sensibilité est faible, de l'ordre de  $10^{-2}$ .

Les méthodes actuelles se basent toujours sur le CD5+ en recherchant une expression différentielle de différents marqueurs entre les cellules B CD5+ normales et les cellules de LLC. Dix combinaisons ont été testées par un consortium international sous l'égide de l'European Research Initiative on CLL (ERIC), qui a retenu trois combinaisons d'anticorps pour la mesure de la MRD : CD20/CD38/CD19/CD5, CD22/CD81/CD19/CD5, et CD43/CD79b/CD19/CD5 (les marqueurs CD20, CD81 et CD22 étant sous-exprimés, et le marqueur CD43 étant surexprimé dans cette maladie) ; de plus, l'ERIC a permis de standardiser les méthodes de détection de la maladie résiduelle (140). L'augmentation du nombre de sondes colorées permet de diminuer le matériel nécessaire et d'augmenter la sensibilité de la technique (140,143) ; ainsi une combinaison CD43/CD79b/CD20/CD81/CD19/CD5 est actuellement considérée comme suffisante et sans redondance pour détecter une MRD à un seuil de  $10^{-5}$  dans la LLC (144).

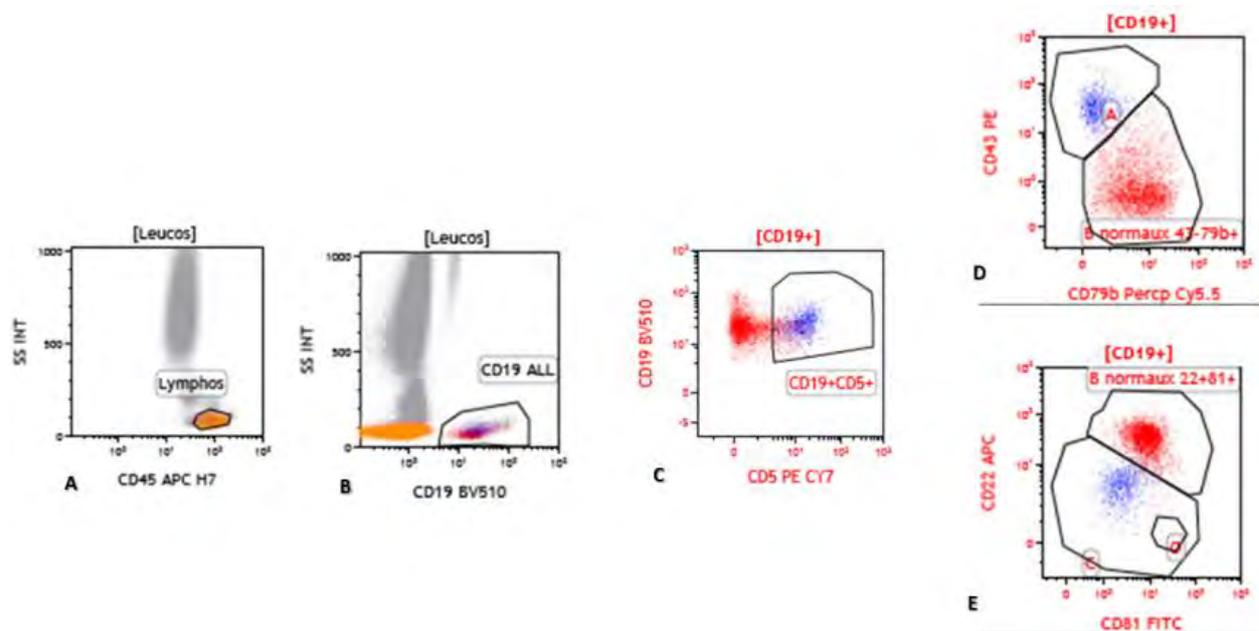
Une étude combinée de 530 prélèvements a confirmé l'équivalence des techniques ASO-PCR et CMF 4 couleurs pour une détection de maladie résiduelle à un seuil de  $10^{-4}$  (145). Ainsi ces deux techniques sont-elles des références dans la mesure de la MRD (2).

Le Tableau 7 récapitule les avantages et inconvénients de la biologie moléculaire et de la cytométrie en flux pour l'étude de la maladie résiduelle minimale dans la LLC.

La Figure 8 montre un exemple de MRD quantifiée à 0,2 % dans la LLC selon les recommandations ERIC en se basant sur les panels CD22/CD81/CD19/CD5 et CD43/CD79b/CD19/CD5.

Tableau 7 : avantages et inconvénients de la CMF et de la biologie moléculaire pour l'étude de la MRD dans la LLC

Caractéristique	CMF	ASO RQ-PCR
Nombre de cellules nécessaires	$\geq 10^7$ leucocytes	$\cong 10^6$ leucocytes
Délai de résultat	Quelques heures	Quelques jours/semaines
Nécessité d'un prélèvement initial	Non	Oui
Délai d'analyse/stabilité	48 heures	-
Sensibilité	$10^{-4}$ , fixe	$10^{-5}$ , mais variabilité interindividuelle
Test patient-spécifique	Non	Oui
Applicabilité	> 95 %	$\cong 90$ %
Mobilisation du laboratoire	Modeste	Très importante



### 1.6.3 Signification de la MRD

D'une manière générale et intuitive après chimiothérapie et ICT, OS et PFS sont d'autant meilleures que le patient est en réponse (146). Une corrélation indépendante d'autres facteurs pronostiques entre l'obtention d'une maladie résiduelle indétectable et une survie améliorée (OS et PFS) a été démontrée avec plusieurs associations thérapeutiques (96,147–149). L'importance de l'obtention d'une MRD négative est bien illustrée par les données de l'essai CLL8 dans lequel la PFS était dictée par la MRD indépendamment du type de traitement reçu en induction.

Depuis maintenant plus de 15 ans, les méthodes de MRD se sont améliorées à plusieurs égards : standardisation, sensibilité accrue et caractère quantitatif. Ce dernier point a permis de montrer que la PFS était corrélée au niveau de MRD atteint (96,147,150). Le seuil de quantification recommandé est de  $10^{-4}$  mais les techniques actuelles permettent une détection en-deçà de ce niveau, ce qui témoigne de la persistance d'une maladie résiduelle potentiellement quantifiable. Il apparaît donc important de développer des techniques de plus en plus sensibles afin de pouvoir étudier plus précisément la cinétique de la MRD ; en effet, les rechutes sont constamment précédées par une ré-augmentation de la MRD (151).

La première démonstration d'un avantage en OS à l'obtention d'une MRD négative date de 2001 : chez des patients en RC suite à un traitement comportant de l'alemtuzumab plus ou moins associé à une autogreffe de cellules souches, l'obtention d'une MRD médullaire négative à  $5 \cdot 10^{-3}$  était statistiquement associée à une OS plus longue (152). Cette étude ne prenait pas en compte les facteurs pronostiques bien connus maintenant et utilisait un seuil de MRD différent de celui actuellement recommandé, mais un bénéfice à l'obtention d'une MRD négative en termes d'OS a été retrouvé par la suite dans d'autres publications intégrant des modèles multivariés ainsi que des patients au-delà de la première ligne de traitement (96,113,149,153). Chez des patients en rechute recevant de l'alemtuzumab en monothérapie jusqu'à négativation de la MRD médullaire en CMF 4 couleurs (seuil de  $10^{-4}$ ), on retrouve une OS médiane non atteinte si la MRD est négativée, alors qu'elle est de 19 mois en l'absence de négativation (148). L'analyse de l'essai CLL8 a permis de mettre en évidence un bénéfice à l'obtention d'une MRD inférieure à  $10^{-2}$  en termes d'OS, mais le seuil de  $10^{-4}$  était, lui, prédictif de PFS uniquement.

### 1.6.4 Facteurs influençant le rôle pronostique de la MRD

#### 1.6.4.1 Valeur propre de la croissance de la MRD

Certaines études ont démontré le rôle pronostique de la rapidité de croissance de la MRD. Après RFC, la valeur de MRD à un an de la fin du traitement ( $\leq 1\%$  ou  $> 1\%$ ), ou son augmentation d'au moins 1 log par rapport à l'évaluation de fin de traitement ont été décrites comme associées à une PFS raccourcie (154,155).

#### 1.6.4.2 Corrélation entre facteurs pronostiques intrinsèques et croissance de la MRD

Une étude de croissance de la MRD chez les patients inclus dans l'essai CLL8 et n'ayant pas rechuté à un an de la fin du traitement a permis de mettre en évidence le rôle indépendant de la croissance de la MRD en termes de prédiction de PFS. La croissance de MRD était pronostique y compris pour prédire les rechutes survenant lors de la deuxième année de suivi (très graves). Les facteurs associés à une croissance plus rapide durant la deuxième année de suivi étaient les suivants : Binet B ou C en pré-thérapeutique, délétion 11q ou caryotype normal plutôt que trisomie 12 ou délétion 13q isolée, statut *IGHV* non muté,

thymidine-kinase >10 U/L. Il est intéressant de noter que le bras de traitement n'avait aucun effet sur la croissance de la MRD, tout comme la valeur initiale de  $\beta$ 2-microglobuline, le genre, la présence de signes B ou la lymphocytose pré-thérapeutique (17).

Avec d'autres schémas thérapeutiques, certains facteurs ont été associés à une ré-augmentation du niveau de MRD au cours du suivi post-thérapeutique : ZAP-70 et le statut mutationnel *IGHV* dans une étude espagnole s'intéressant à l'association Fludarabine, Cyclophosphamide et Mitoxantrone (FCM) avec un seuil de MRD de  $10^{-4}$  (156) ; statut mutationnel *IGHV*, del11q, lymphocytose et temps de doublement lymphocytaire pré-thérapeutiques dans une étude allemande s'intéressant à l'autogreffe et quantifiant la MRD par méthode moléculaire (157).

#### 1.6.5 Une mesure de la MRD en cours de traitement ?

Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, l'évaluation de la MRD en cours de traitement a un rôle pronostique indépendant, et sert dorénavant à guider les indications d'allogreffe de CSH notamment (158). La LLC est différente car très peu de patients sont allogreffés, mais une évaluation intermédiaire de la MRD pourrait permettre d'adapter le traitement (avec notamment la question de l'arrêt du traitement en cas de MRD négative).

Chez les patients traités par RFC dans l'essai CLL8, la signification pronostique d'obtenir une MRD négative dans le sang était semblable, que cette négativité soit obtenue après 3 ou après 6 cycles de RFC (PFS médiane de respectivement 64 et 68,7 mois). Ceci peut laisser penser qu'une désescalade thérapeutique serait envisageable après obtention d'une MRD négative post-RFC, mais reste à prouver avec une méthodologie adaptée. De même, une étude américaine concernant 148 patients traités par RFC en première ligne disposant d'une évaluation médullaire de MRD après 3 et 6 cycles a été publiée. Cinquante patients ont stoppé le traitement précocement pour toxicité. Il apparaît dans cette étude que la PFS des patients stoppant le traitement après 3 cycles en situation de MRD négative n'est pas différente de celle des patients ayant une MRD négative à l'issue des 6 cycles, qu'ils aient ou non une MRD positive après 3 cycles. La PFS la plus défavorable était constatée chez les patients ayant une MRD positive après 3 cycles et stoppant le traitement (153). La cohorte a été implémentée de plus de 100 patients avec des résultats similaires présentés en décembre dernier (159).

Cependant le délai nécessaire à une reconstitution hématopoïétique suffisante pour permettre l'interprétation de la MRD sanguine rend difficile toute approche de traitement guidée par la négativation précoce de la MRD.

#### 1.6.6 Signification d'une MRD négative après allogreffe de cellules souches

L'allogreffe de CSH voit ses indications se restreindre avec l'arrivée des nouveaux traitements de la LLC. En effet si cette procédure est la seule permettant la guérison de la LLC, elle n'en demeure pas moins grevée d'une morbidité et d'une mortalité qui ne la font proposer qu'aux sujets jeunes et présentant une maladie agressive.

Le rôle de la MRD en post-allogreffe est dorénavant bien démontré, et l'obtention d'une MRD négative dans les 12 mois suivant la procédure est associée à un risque diminué de rechute. La surveillance de la MRD s'impose dans ce contexte car elle permettrait de diminuer le risque de rechute en modulant l'immunosuppression (160) et dans l'actualisation récemment rapportée de l'essai allemand CLL3X, la meilleure PFS était obtenue chez les patients obtenant une MRD indétectable à 12 mois *via* une baisse de l'immunosuppression, suggérant un effet GVL important (161). Cette stratégie a été testée

prospectivement lors de l'essai RICAC-PMM où de nombreux patients répondaient à une modulation de l'immunosuppression post-allogreffe, avec des négativations de MRD ; cependant certains patients semblaient ne pas répondre à l'immuno-modulation, ce qui pose la question de maladies moins sensibles à l'immunothérapie, qu'il conviendrait d'identifier (162). Un autre marqueur prédictif d'un devenir péjoratif après allogreffe est évidemment la présence d'un chimérisme en faveur du receveur (163).

#### 1.6.7 Rôle de la MRD dans la prise de décisions

La MRD n'a pas d'application clinique en routine pour l'heure. Elle reste cependant un critère se substituant à la PFS pour les études d'ICT, dans lesquelles elle peut servir de marqueur pour proposer un traitement d'entretien si elle demeure positive, ou à l'inverse pour stopper une immunochimiothérapie si la MRD est indétectable de manière précoce.

##### 1.6.7.1 Une maintenance guidée par la MRD ?

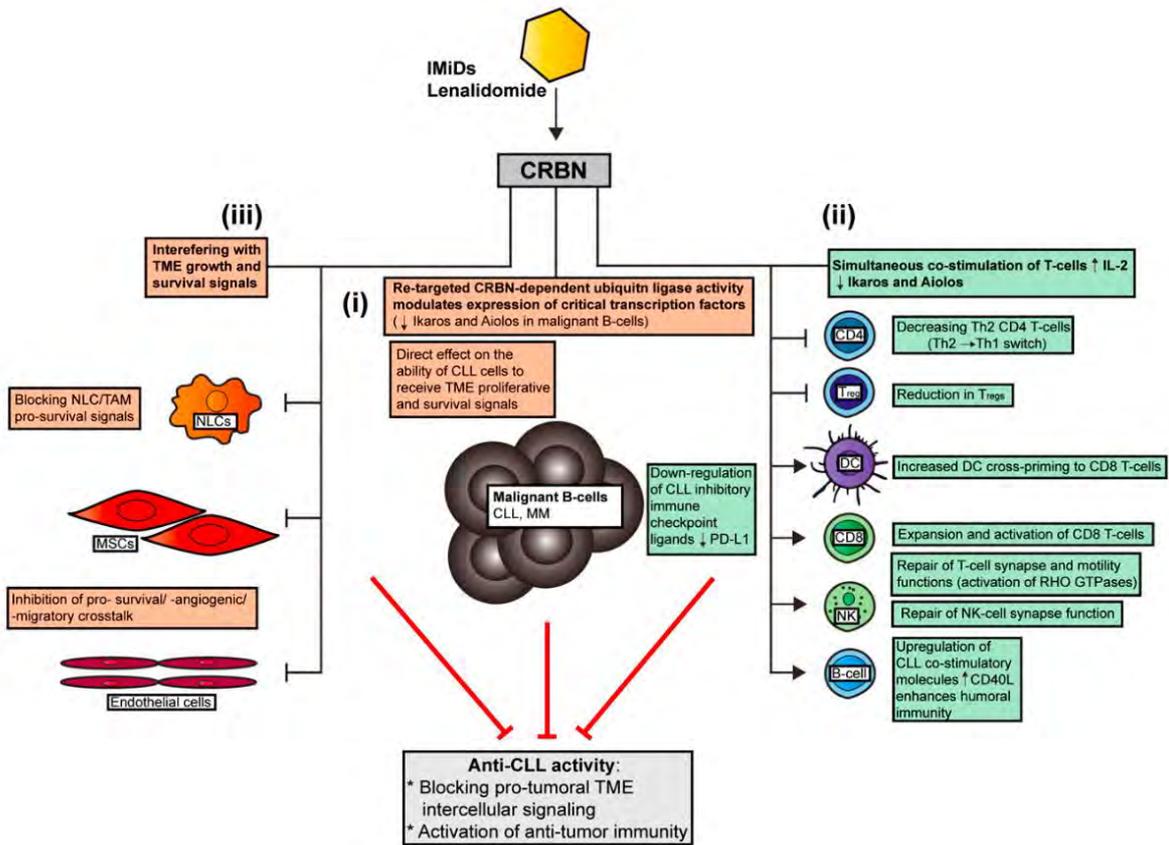
Certaines études ont donc commencé à s'intéresser à une maintenance après ICT d'induction en cas de persistance d'une MRD, notamment dans le but de prolonger la PFS : l'alemtuzumab a été utilisé et a permis l'obtention de MRD négatives, mais s'est avéré trop toxique, sans gain de survie globale (164).

Plus récemment, plusieurs groupes ont proposé des consolidations à base de Rituximab, par exemple l'essai français CLL2007SA qui a permis de prolonger significativement la PFS de patients de plus de 65 ans sans del17p qui recevaient une maintenance par Rituximab après 4 cycles de RFC.

Le lenalidomide est particulièrement intéressant dans les hémopathies lymphoïdes B de par ses capacités de restauration de la synapse immunologique et d'augmentation de l'ADCC (44,165,166), d'une manière générale et après ICT pour une LLC.

De plus, son mécanisme d'action original implique les lymphocytes CD4 du micro-environnement. En effet, comme tous les IMiDs le lenalidomide augmente l'ubiquitinylation et la dégradation d'IKZF1 et IKZF3 par le protéasome (via un mécanisme impliquant le cœlome), ce qui a diverses conséquences (Figure 9) :

- Au niveau des cellules de LLC : diminution de leur réponse aux signaux pro-tumoraux en provenance du micro-environnement, régulation positive des molécules de costimulation CD80 et CD86, augmentation de l'expression de CD40L (associée à une restauration de l'immunité humorale normale chez les patients répondeurs). Une cytotoxicité directe a été observée dans le myélome, mais pas dans la LLC.
- Au niveau des cellules T : augmentation de la synthèse d'IL2 (IKZF1 et IKZF3 étant des répresseurs du promoteur de l'IL2), polarisation Th1 des lymphocytes T CD4 aux dépens des Th2, inhibition des Treg et restauration de la capacité d'assemblage des protéines du cytosquelette (restauration de la synapse immunologique et des capacités de motilité) (167–169).
- Au niveau d'autres cellules du micro-environnement : diminution de la réponse aux signaux de survie envoyés par les NLC, inhibition de CXCL12 et diminution du VEGF et du FGF.



**Figure 9 : mécanisme d'action du lenalidomide dans la LLC. (i) Action sur les cellules de LLC (ii) Action sur les lymphocytes T et NK (iii) action sur les autres cellules du micro-environnement. D'après (170).**

Ainsi le lenalidomide a montré une restauration de la synapse immunologique conjointement à des négativations de MRD après ICT à base de pentostatine-cyclophosphamide et rituximab ; la synapse immunologique était d'autant mieux restaurée que le nombre de cycles de lenalidomide était important, et la PFS semblait améliorée par comparaison historique avec des patients traités par cette ICT (165). Trois communications orales concernaient une maintenance par lenalidomide après ICT lors du dernier congrès de la société américaine d'Hématologie.

**L'étude CLLM1** du groupe allemand a randomisé l'administration en maintenance de lenalidomide (jusqu'à 15 mg) ou de placebo chez 89 patients ayant répondu à 4 cycles d'ICT en première ligne et ayant des facteurs de mauvais pronostic (MRD détectable associée à un statut *IGHV* non muté ou à une délétion de *TP53*). Après un suivi médian de 17,9 mois, la PFS médiane est de 13,3 mois dans le bras placebo et non atteinte dans le bras lenalidomide (HR=0,168) (131).

**L'essai franco-australien CLL6-RESIDUUM** a vu ses résultats intermédiaires communiqués. Après 6 cures de RFC en première ligne, l'étude a randomisé l'administration d'une maintenance par lenalidomide (10 mg) contre une simple surveillance chez 79 patients présentant une MRD positive (sanguine ou médullaire). L'augmentation de MRD a été plus fréquente dans le bras observation (68 %) que dans le bras lenalidomide (32 %). La diminution de MRD a été plus fréquente dans le bras lenalidomide (27 %) que dans le bras

observation (5 %). Après un an de traitement, 4 des 9 patients du bras lenalidomide ont négativé leur MRD médullaire (171).

**L'essai CONTINUUM** a randomisé l'adjonction d'une maintenance par lenalidomide (jusqu'à 10 mg) contre placebo après obtention d'une réponse au moins partielle à une seconde ligne d'ICT, ce qui a permis d'augmenter la PFS médiane de 9,2 à 33,9 mois (172).

#### 1.6.7.2 *Vers un traitement pré-emptif de la rechute ?*

Il a été suggéré que la ré-augmentation d'une MRD indétectable à l'issue d'une ICT d'induction pourrait prédire une rechute dans les 2 ans, ce qui pourrait également ouvrir la voie à des traitements préemptifs dans cette fenêtre (159), comme cela est testé dans d'autres hémopathies malignes notamment le LCM (173–175).

#### 1.6.8 Quelles sont les limites de la mesure de la MRD ?

La LLC est une maladie « multi-compartimentale » (sang, moelle, organes lymphoïdes secondaires), avec d'emblée une atteinte médullaire, ganglionnaire, splénique et hépatique (ces atteintes pouvant rester microscopiques). Or la MRD ne se mesure que dans le sang ou la moelle osseuse, et il peut persister des cellules tumorales dans un autre organe (« MRD nodale ») ; cette maladie résiduelle est difficilement mesurable en routine et il a été rapporté récemment que la présence d'une MRD négative avec persistance d'un syndrome tumoral ganglionnaire diminuait nettement la PFS médiane par rapport à une RC avec MRD négative (de 60,7 à 30,9 mois, HR=2,6, p<0,001) (176).

#### 1.6.9 Questions en suspens concernant la mesure de la MRD

##### 1.6.9.1 *Quel site prélever ?*

La mesure conjointe de la MRD dans la moelle et dans le sang a permis de montrer que la clairance était plus précoce dans le sang (après R-FCM, 21 % des patients présentent une MRD sanguine négative et une MRD médullaire persistante (177)). Ceci a également été observé avec des mesures non concomitantes dans des essais cliniques (96,116,147). L'étude CLL2M a retrouvé des PFS plus courtes pour les mêmes valeurs de MRD lorsqu'elles étaient mesurées dans le sang par rapport à lorsqu'elles étaient mesurées dans la moelle (147). Il est considéré que cette dissociation entre MRD médullaire et sanguine concerne essentiellement les ICT (due aux anticorps monoclonaux) et ne retentit sur la PFS qu'à partir de 3 ans après la fin de traitement (178).

Toutes ces ICT s'inscrivent dans une optique de mise en rémission des patients afin d'obtenir des PFS les plus longues possibles, et une mesure de MRD dans le sang pourrait servir à identifier les patients qui pourraient bénéficier d'une maintenance. A l'inverse lorsque l'objectif du traitement est la guérison et donc l'éradication de la maladie, il paraît logique de viser à une négativité de la MRD non seulement dans le sang mais également dans la moelle.

##### 1.6.9.2 *La mesure de la MRD va-t-elle supplanter les critères IWCLL 2008 ?*

Le suivi à long terme des patients traités par RFC au MDACC retrouvait un avantage en PFS à l'obtention d'une MRD<math>10^{-4}</math>, quelle que soit la réponse selon IWCLL (113).

De manière intéressante, une analyse regroupant 554 des patients traités dans les essais CLL8 (randomisant RFC versus FC) et CLL10 (randomisant RFC versus RB) démontre que le fait d'obtenir une MRD sanguine inférieure à  $10^{-4}$  est un facteur indépendant pour la

prédiction de la PFS et de l'OS contrairement à la réponse partielle (alors que 29,1 % des patients ont une réponse partielle avec MRD $<10^{-4}$ ) ; de plus, les patients ayant une RP avec MRD négative ont une PFS comparable à ceux ayant une RC avec MRD négative, et supérieure à ceux ayant une RC avec MRD positive (176). Cependant il est noté un pronostic différent entre les différents types de RP avec MRD négative selon le site restant envahi. Ces RP avec MRD négative ont été observées avec d'autres associations thérapeutiques et pourraient être le reflet soit de masses tumorales nécrotiques (non actives), soit de la persistance de maladie purement tumorale.

#### *1.6.9.3 Quel rôle pour la MRD avec les nouvelles thérapies ciblées ?*

Les nouvelles thérapies ciblées de type inhibiteurs du BCR n'induisent que très peu de MRD négatives lorsqu'elles sont utilisées en monothérapie si bien que la MRD n'a pas de rôle lors de leur utilisation. La MRD reste importante avec les inhibiteurs de BCL2 et deviendra importante avec les inhibiteurs de BTK en combinaison avec des cytotoxiques. Avec l'association R-bendamustine-ibrutinib, il semble que l'éradication de la MRD survienne chez un petit nombre de patients (<15 %) après plusieurs mois de traitement.

## 2 Rationnel et objectifs de l'étude

Nous avons vu le rôle de la MRD après ICT dans la LLC, et les excellents résultats du schéma RFC dans cette maladie dans les essais cliniques de phase 3 et dans l'étude initiale de phase 2 du MDACC. De nombreux facteurs pronostiques sont étudiés dans ce contexte mais il existe peu de données de vie réelle permettant de surveiller la MRD après RFC, et d'étudier les facteurs qui caractérisent la durée de réponse au niveau individuel.

De plus, la LLC est une maladie très dépendante de son micro-environnement, et les interactions complexes se déroulant dans les centres prolifératifs impliquent les cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes T CD4+. Il nous est donc apparu important d'une part de vérifier la valeur pronostique de la MRD et de sa ré-augmentation après RFC en situation de vie réelle, et d'autre part de déterminer l'influence des cellules normales du système immunitaire sur le pronostic des patients. Les interactions entre cellules normales et cellules de LLC étant réciproques, il nous est apparu important de déterminer si certains sous-groupes de LLC (notamment selon le statut mutationnel *IGHV*) étaient particulièrement sensibles à l'effet de la reconstitution immunitaire.

## 3 Matériel et méthodes

### 3.1 Schéma et objectifs de l'étude

Il s'agit d'une étude de schéma rétrospectif et observationnel, multicentrique.

**L'objectif principal** de l'étude était de déterminer l'influence des cellules immunitaires normales et de la reconstitution du clone leucémique (évaluée par un suivi semestriel de la MRD dans le sang) sur la PFS et sur l'OS.

**Les objectifs secondaires** de l'étude étaient

- de caractériser la population traitée par RFC dans la présente étude,
- d'identifier dans quel sous-groupe de patients l'influence des cellules immunitaires normales permettait de mieux préciser la PFS et l'OS,

### 3.2 Population

En France, les décisions de traitement de cancer se font lors de réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP). En Midi-Pyrénées, les différentes RCP d'hématologie sont centralisées *via* le réseau Oncomip, et les décisions thérapeutiques sont prises par les référents des pathologies concernées. Lorsque la recommandation est une immunochimiothérapie par RFC, elle est assortie d'une recommandation de consultation en fin de traitement avec un référent CHU/IUC, le Pr Ysebaert, qui assure ensuite le suivi des patients LLC RFC. Ainsi, tous les patients traités par RFC en Midi-Pyrénées et inclus dans cette étude ont bénéficié d'une consultation de fin de traitement (EOT) au CHU Purpan (ou à l'IUCT-Oncopôle). Les patients ont bénéficié en pré-thérapeutique d'une recherche de facteurs pronostiques : délétions 11q et 17p en FISH, réalisation d'un caryotype lymphoïde, recherche de mutations *IGHV* en biologie moléculaire. Lorsque la technique était disponible, certains patients ont bénéficié de recherches de mutations *SF3B1*, *NOTCH1*, *TP53*, *BRAF* et *MYD88*.

#### 3.2.1 Critères d'inclusion

Les patients porteurs d'une LLC devaient avoir débuté un traitement par RFC en première ligne après passage en RCP régionale ONCOMIP, et avoir eu au moins un dosage de MRD et un phénotypage lymphocytaire T/B/NK. Nous avons inclus dans notre population les patients traités à l'Institut Bergonié, pour lesquels le Dr Durrieu procède également aux analyses de MRD et de phénotypage lymphocytaire après RFC.

Le traitement par RFC comporte :

- Rituximab : 375 mg/m<sup>2</sup> au premier jour (J1) du cycle numéro 1 puis 500 mg/m<sup>2</sup> à J1 des cycles suivants.
- Fludarabine per os : 40 mg/m<sup>2</sup> par jour de J1 à J3.
- Cyclophosphamide per os : 250 mg/m<sup>2</sup> par jour de J1 à J3.

Les patients ont reçu une injection de Pegfilgrastim 6 mg en sous-cutané à J8 de chaque cycle.

#### 3.2.2 Critères d'exclusion

- Patients ayant déjà reçu un traitement de la LLC quel qu'il soit (y compris chloraminophène en monothérapie).

- Patients traités par RFC n'ayant pas eu de dosages séquentiels de MRD.

### 3.3 Recueil des données

La population de l'étude (Midi-Pyrénées) a été établie à partir de la liste des examens de CMF pratiqués au CHU de Toulouse.

Les résultats des divers examens biologiques ont été recueillis par le serveur SRI® (serveur résultats informatique) lorsqu'ils étaient pratiqués au CHU de Toulouse, et *via* les comptes-rendus d'hospitalisation lorsque les patients étaient traités en centres hospitaliers généraux (CHG). Les dates des cures de RFC ont été recueillies par le logiciel Chimioweb® du CHU de Toulouse, et par les comptes-rendus médicaux des différentes venues et/ou après contact téléphonique avec les pharmaciens hospitaliers pour les données des CHG. En consultation de fin de traitement (EOT, 2 à 6 mois après la dernière cure de RFC) puis tous les 6 mois, outre l'examen clinique les patients bénéficiaient de la mesure de la maladie résiduelle par CMF 4 à 6 couleurs, ainsi que d'un phénotypage lymphocytaire (T/B/NK), d'un hémogramme et d'un dosage pondéral des immunoglobulines.

Pour les patients dont les dernières données dataient de plus d'un an, les services des CHG, les médecins traitants ou à défaut les patients eux-mêmes étaient contactés par téléphone dans le but d'obtenir une date de dernières nouvelles ou de décès.

Les données suivantes étaient recueillies lorsqu'elles étaient disponibles en pré-thérapeutique : LDH,  $\beta$ 2-microglobuline, test de Coombs, lymphocytose.

Les données concernant la population traitée sur l'institut Bergonié de Bordeaux nous ont été transmises par le Dr Durrieu, biologiste médicale.

### 3.4 Analyses en cytométrie

La MRD a été techniquée en CMF 4 à 6 couleurs selon les recommandations ERIC, avec un seuil de positivité de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$ . Les deux combinaisons d'antigènes membranaires CD22/CD81/CD19/CD5 et CD43/CD79b/CD19/CD5 ou bien la combinaison en un seul tube CD43/CD79b/CD22/CD81/CD19/CD5 ont été utilisées. En CMF 4 couleurs, les cellules de LLC étaient comptabilisées de la manière suivante :

- Pourcentage de cellules CD22<sup>low</sup>/CD81<sup>low</sup>/CD19+/CD5+ parmi les leucocytes totaux
- Pourcentage de cellules CD43<sup>high</sup>/CD79b<sup>low</sup>/CD19+/CD5+ parmi les leucocytes totaux
- La valeur de MRD correspondait à la moyenne de ces deux valeurs.

Les analyses ont été réalisées en consultation de fin de traitement (EOT, 2 à 6 mois après la dernière cure de RFC), puis tous les 6 mois jusqu'à M36 (36 mois après EOT).

### 3.5 Critères de jugement

Le critère principal de jugement était la **survie sans progression (PFS)** définie par le délai entre la date de début de traitement (J1C1 pour premier jour du premier cycle de RFC) et le décès (toutes causes confondues) ou la progression de la maladie (quelle qu'elle soit). Les patients en vie et sans progression ont été censurés à la date de dernières nouvelles.

**La survie globale (OS)** a été définie par le délai entre le J1C1 et le décès (toutes causes confondues) ou bien la date de dernière nouvelles (les données étant alors censurées).

**Les infections** ont été définies par toute infection récurrente sinusienne et/ou pulmonaire, et toute infection nécessitant un traitement médicamenteux (antibiotique et/ou antiviral).

Les infections suivantes ont été considérées comme **infections opportunistes** : zona, varicelle, maladie à CMV, réactivation d'hépatite B, réactivation virale responsable de syndrome d'activation macrophagique, leucoencéphalopathie multifocale progressive, hépatite E chronique, pneumocystose pulmonaire, aspergillose invasive quelle qu'en soit la localisation, cryptococcose neuroméningée, mucormycose quelle qu'en soit la localisation, toxoplasmose cérébrale, méningite virale et/ou bactérienne, otite maligne externe.

Les **infections graves** ont été définies par toute infection nécessitant une hospitalisation.

Le syndrome de Richter a été pris en compte lorsqu'il était mentionné dans le dossier avec des arguments en sa faveur, qu'ils soient formels (biopsie le confirmant ou envahissement médullaire par des grandes cellules) ou suffisamment probants (PET-scanner montrant une valeur de SUV dépassant 10 ou cytoponction ganglionnaire retrouvant des grandes cellules). Ni le sous-type histologique (Hodgkinien ou non) ni la relation clonale avec la LLC sous-jacente n'ont été relevés.

Les cancers secondaires ont été définis comme tout cancer survenant après le J1C1 (hormis carcinomes basocellulaires).

### 3.6 Définition des covariables

**La MRD** a été prise en compte en tant que variable quantitative dépendante du temps ainsi qu'en classes selon les niveaux définis par le groupe allemand : MRD basse  $<10^{-4}$ ,  $10^{-4} \leq \text{MRD}$  intermédiaire  $<10^{-2}$ , MRD haute  $>10^{-2}$  (96).

**Les CD4** ont été pris en compte en tant que variable quantitative dépendante du temps ainsi qu'en tant que variable binaire selon un seuil fixé à  $200/\text{mm}^3$  (fréquemment utilisé dans le VIH et pour guider les prophylaxies anti-infectieuses après ICT).

Pour apprécier l'influence de la croissance du niveau de MRD et des différentes cellules immunitaires normales sur la PFS et sur l'OS, nous avons créé des **variables Delta** CD4, Delta CD8, Delta NK et Delta MRD, définies à chaque temps  $t$  de la manière suivante :

$$\Delta_{Xt} = X_t - X_{EOT}$$

### 3.7 Analyses statistiques

Les caractéristiques de la population ont été décrites par les statistiques usuelles. Les variables quantitatives ont été décrites par la médiane, le minimum, le maximum et le nombre de données manquantes ; les variables qualitatives par les fréquences, les pourcentages et le nombre de données manquantes de chaque modalité.

Les données de survie ont été résumées par la méthode de Kaplan-Meier et présentées avec leurs intervalles de confiance à 95 %. Les analyses univariées et multivariées ont été réalisées avec le modèle de Cox. Des analyses de Landmark et des modèles de Cox avec covariables dépendantes du temps ont été effectués pour les modèles utilisant des covariables mesurées après l'évaluation pré-thérapeutique.

Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées par le test du Chi-2 ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives.

Tous les tests étaient bilatéraux et le seuil de significative a été fixé à 0,05. L'analyse statistique a été réalisée sous le logiciel STATA version 13 (Stata Corporation, College Station, TX, USA)

## 4 Résultats

### 4.1 Caractéristiques de la population

Entre le 07/06/2005 et le 26/01/2016, 162 patients traités par RFC en première ligne en région Midi-Pyrénées et sur l'institut Bergonié disposaient d'un suivi de MRD.

Les patients étaient des hommes pour 69,1 % (n=112) et avaient un âge médian au diagnostic de 58 ans.

A l'initiation du RFC, le diagnostic de LLC datait de 22 mois en médiane (de 1 jour à 16 ans et 11 mois) et l'âge médian était de 61,5 ans. La majorité des patients était stade B de Binet (21,3 %, 53,1 % et 25,6 % Binet A, B et C respectivement). La  $\beta$ 2-microglobuline était supérieure à 3,5 mg/L chez 78,3 % des patients, et les LDH étaient élevées chez 54,4 % des patients. Les lymphocytes en pré-thérapeutique étaient en médiane à 90,6 G/L (valeurs extrêmes : 1,3 à 888 G/L). Une mutation *IGHV* était retrouvée chez 36,6 % des patients. La délétion 13q était l'anomalie cytogénétique la plus fréquemment observée (37,4 % des patients), suivie de la trisomie 12, la délétion 11q, la délétion 6q, le réarrangement *IgH-BCL2*, et la délétion 17p (24,4 %, 22,2 %, 12,8 %, 4,8 %, 3,9 % respectivement). Un caryotype complexe était retrouvé chez 21,6 % des patients. Deux patients avaient une mutation *TP53*, dont un avait également une délétion 17p. Parmi les patients ayant cette information disponible, les mutations *NOTCH1*, *SF3B1* et *MYD88* étaient présentes chez 16,2 %, 8,8 % et 1,5 % des patients. Aucun patient n'avait de mutation de *BRAF*. Les caractéristiques pré-thérapeutiques des patients sont résumées dans le Tableau 8.

Les centres ayant pris en charge les patients étaient les suivants : CHG d'Albi (n=7), CHG d'Auch (n=13), institut Bergonié de Bordeaux (n=25), CHG de Brive (n=1), CHG de Cahors (n=4), CHG de Carcassonne (n=1), CHG de Castres (n=8), CHG de Foix (n=4), CHG de Montauban (n=4), clinique de l'Occitanie de Muret (n=1), clinique Marzet de Pau (n=1), CHG de Rodez (n=4), CHG de Tarbes (n=5) clinique Pasteur de Toulouse (n=3), CHU de Toulouse (n=77), hôpital Joseph Ducuing de Toulouse (n=2), CHG de Villeneuve-sur-Lot (n=2).

Caractéristique pré-RFC	n (%) ou médiane [minimum-maximum]
Hommes	112 (69,1)
Femmes	50 (30,9)
> 65 ans	58 (35,8)
≤ 65 ans	104 (64,2)
Binet A	34 (21,3)
Binet B	85 (53,1)
Binet C	41 (25,6)
ND	2
Délai diagnostic-RFC (mois)	22,1 [0,03-203,00]
Lymphocytes (G/L) (n=114)	90,6 [1,30-888,0]
β2-microglobuline	
≤ 3,5 mg/L	15 (21,7)
> 3,5 mg/L	54 (78,3)
ND	93
LDH	
Normales	52 (45,6)
Elevées	62 (54,4)
ND	48
Statut <i>IGHV</i> muté	48 (36,6)
Statut <i>IGHV</i> non muté	83 (63,4)
ND	31
Délétion 13q présente	49 (37,4)
Délétion 13q absente	82 (62,6)
ND	31
Trisomie 12 présente	32 (24,4)
Trisomie 12 absente	99 (75,6)
ND	31
Délétion 11q présente	34 (22,2)
Délétion 11q absente	119 (77,8)
ND	9
Délétion 6q présente	14 (12,8)
Délétion 6q absente	95 (87,2)
ND	53
t(14;18) présente	5 (4,6)
t(14;18) absente	104 (95,4)
ND	53
Délétion 17p présente	6 (3,9)
Délétion 17p absente	146 (96,1)
ND	10
Caryotype complexe présente	87 (78,4)
Caryotype complexe absente	24 (21,6)
ND	51
Mutation <i>TP53</i> présente	2 (2,9)
Mutation <i>TP53</i> absente	68 (97,1)
ND	92
Mutation <i>NOTCH1</i> présente	11 (16,2)
Mutation <i>NOTCH1</i> absente	57 (83,8)
ND	94
Mutation <i>SF3B1</i> présente	6 (8,8)
Mutation <i>SF3B1</i> absente	62 (91,2)
ND	94
Mutation <i>MYD88</i> présente	1 (1,5)
Mutation <i>MYD88</i> absente	66 (98,5)
ND	95
Mutation <i>BRAF</i> absente	67 (100)
ND	85

Tableau 8 : caractéristiques pré-thérapeutiques de la population

## 4.2 Résultats globaux du RFC

Le nombre de cycles reçus allait de 1 à 6, avec un premier quartile de 6 cycles. Seulement 3 patients ont reçu moins de 4 cycles de RFC.

La consultation de fin de traitement a eu lieu en médiane 2,9 mois après la date de la dernière cure de RFC. Les caractéristiques de fin de traitement des patients sont résumées dans le Tableau 9. La réponse à EOT était une RC pour 62,4 % des patients, une RCi pour 33,8%, une RP pour 2,5 %, une maladie stable et une maladie progressive pour 0,6 % chacune.

La MRD médiane était de 0,001 % (intervalle 0,000 à 31,5 %), ce qui se traduisait dans nos trois classes en : MRD indétectable (65,3 %), intermédiaire (27,2 %) et haute (7,5 %). La médiane par  $\text{mm}^3$  des lymphocytes CD4, CD8 et NK était de 153,5, 153 et 114 respectivement. Les CD4 étaient inférieurs ou égaux à  $200/\text{mm}^3$  chez 64,2 % des patients, et strictement supérieurs à  $200/\text{mm}^3$  chez 35,8 %. La répartition des CD4 et de la MRD à EOT et lors des différents suivis est représentée sur les Figure 10 et Figure 11.

**Tableau 9 : résultats globaux du RFC**

<b>Caractéristique en fin de traitement</b>	<b>n (%) ou médiane [minimum-maximum]</b>
<b>Délai dernière cure-EOT (mois)</b>	2,9 [0,03-7,50]
<b>Nombre de RFC reçus</b>	6 [1-6]
<b>Réponse</b>	
• Réponse complète (RC)	98 (62,4)
• RC avec récupération incomplète (RCi)	53 (33,8)
• Réponse partielle	4 (2,5)
• Maladie stable	1 (0,6)
• Maladie progressive	1 (0,6)
• Information non disponible	5
<b>MRD en classes (n=147)</b>	
• Basse	96 (65,3)
• Intermédiaire	40 (27,2)
• Elevée	11 (7,5)
<b>Numération des CD4 (<math>/\text{mm}^3</math>) (n=148)</b>	153,5 [17,0-1389,0]
<b>CD4 en classes (n=148)</b>	
• $\leq 200/\text{mm}^3$	95 (64,3)
• $> 200/\text{mm}^3$	53 (35,8)
<b>Numération des CD8 (<math>/\text{mm}^3</math>) (n=148)</b>	153,0 [5,0-2500,0]
<b>Numération des NK (<math>/\text{mm}^3</math>) (n=119)</b>	114,0 [3,0-414,0]

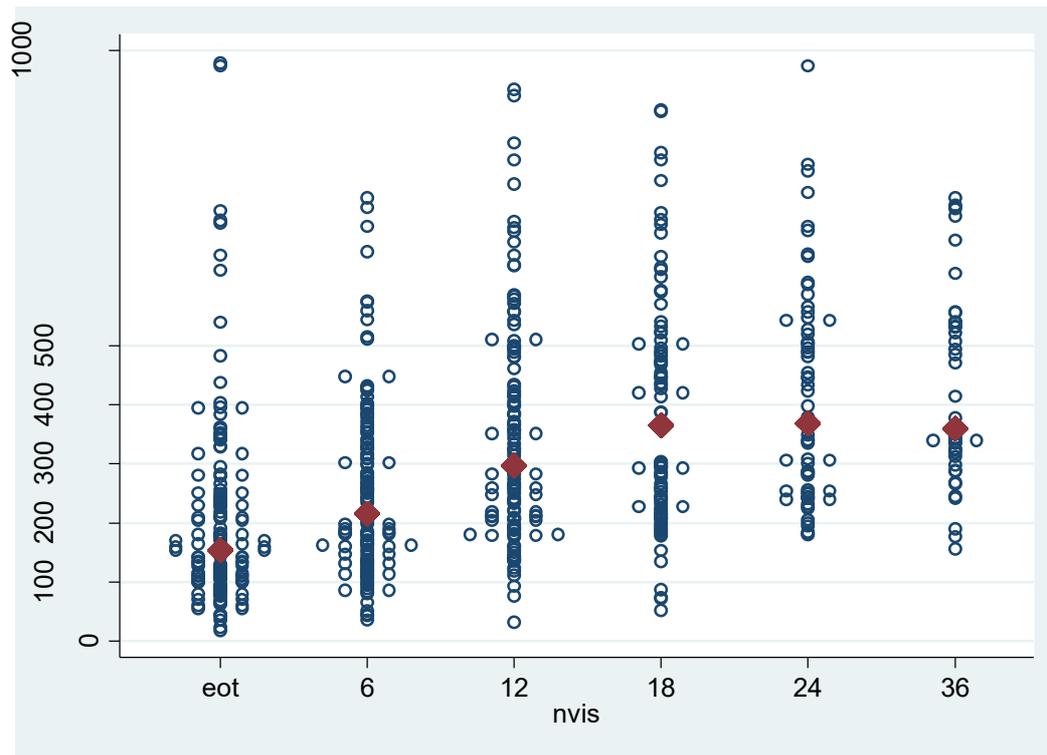


Figure 10 : distribution des valeurs de CD4/mm<sup>3</sup> à EOT et aux différentes visites de suivi. Chaque point bleu représente la valeur d'un patient. Les losanges rouges représentent la médiane des valeurs pour chaque visite

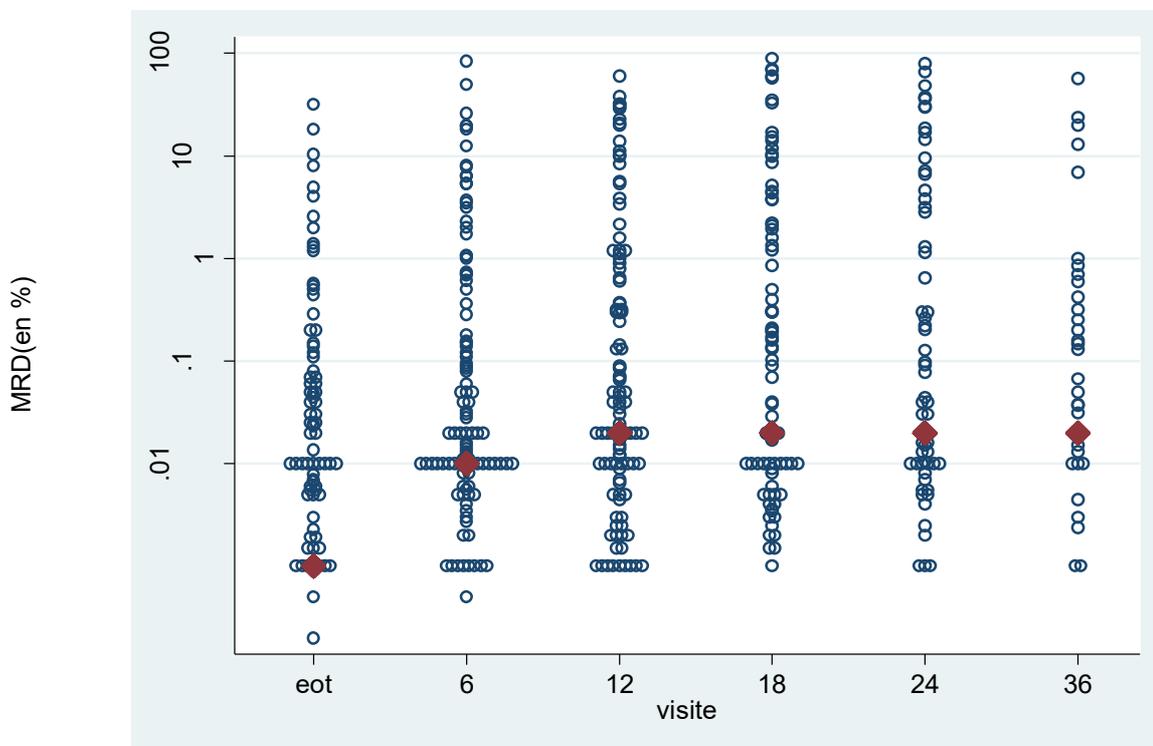


Figure 11 : distribution des valeurs de MRD (en %) à EOT et aux différentes visites de suivi. Chaque point bleu représente la valeur d'un patient (valeurs de 0 non représentées). Les losanges rouges représentent la médiane des valeurs pour chaque visite.

### 4.3 Survie sans progression – PFS

Après un suivi médian de 60,5 mois, 75 patients (46,3 %) ont rechuté ou sont décédés. La PFS est de 53,7 %, avec une estimation de PFS médiane de 65,7 mois (95%CI [54,5-74,7 mois]). Un syndrome de Richter a été développé par 10 patients (6,2 % de la population d'étude) avec un délai médian de 59,5 mois (21,1 à 139,8 mois).

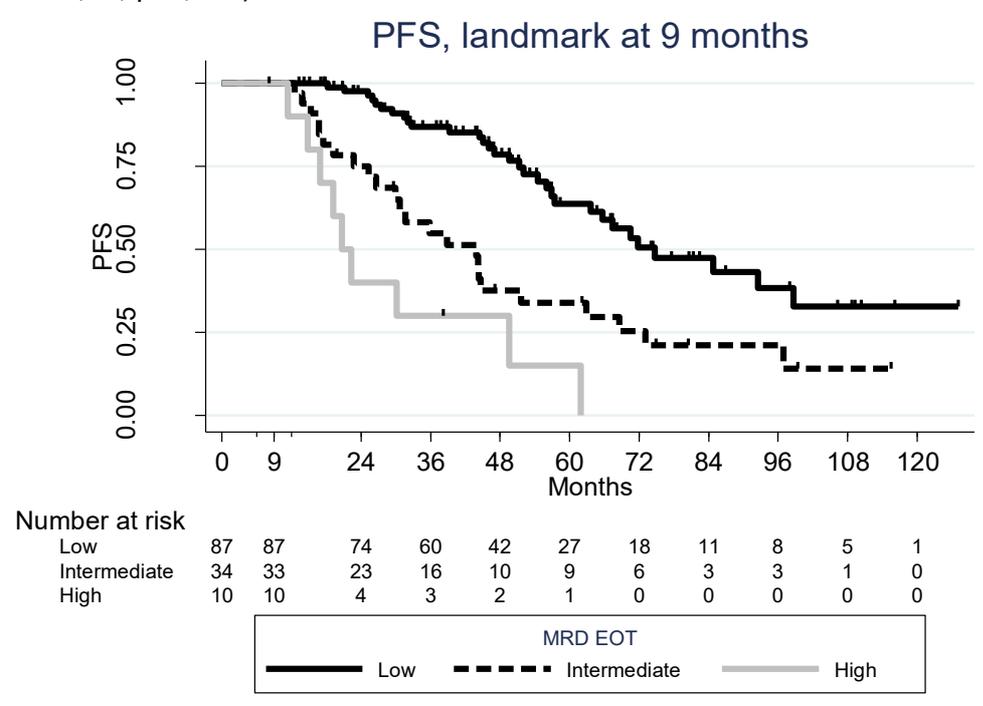
En analyse univariée, les facteurs initiaux statistiquement associés à la PFS étaient la présence d'une délétion 11q (PFS à 5 ans de 35,1 % en cas de del11q contre 60,9 % en son absence, HR=2,19, p=0,002), la présence d'une del17p et/ou d'une mutation *TP53* (PFS à 5 ans de 44,4 % contre 57,4 %, HR=3,87, p=0,013) et un statut *IGHV* non muté (PFS à 5 ans de 71,7 % en cas de mutation *IGHV* contre 45,8 % en cas de statut non muté, HR=2,55, p=0,002). Les variables dépendantes du temps associées à la PFS étaient les CD4 en continu (pour une valeur de CD4 plus élevée de 100/mm<sup>3</sup> : HR=1,13, p=0,001), les NK en continu (pour une valeur de NK plus élevée de 100/mm<sup>3</sup> : HR=1,22, p=0,012) et la MRD, qu'elle soit prise en tant que variable continue (HR=1,04, p<0,001) ou en classes (MRD haute par rapport à basse : HR=10,22, p<0,001). Le fait d'avoir des CD4 supérieurs à 200/mm<sup>3</sup> indépendamment du temps de mesure n'était pas significativement associé à la PFS (p=0,217). Les résultats de l'influence des facteurs initiaux sur la PFS figurent dans le Tableau 10.

**Tableau 10 : facteurs initiaux et PFS : analyse univariée**

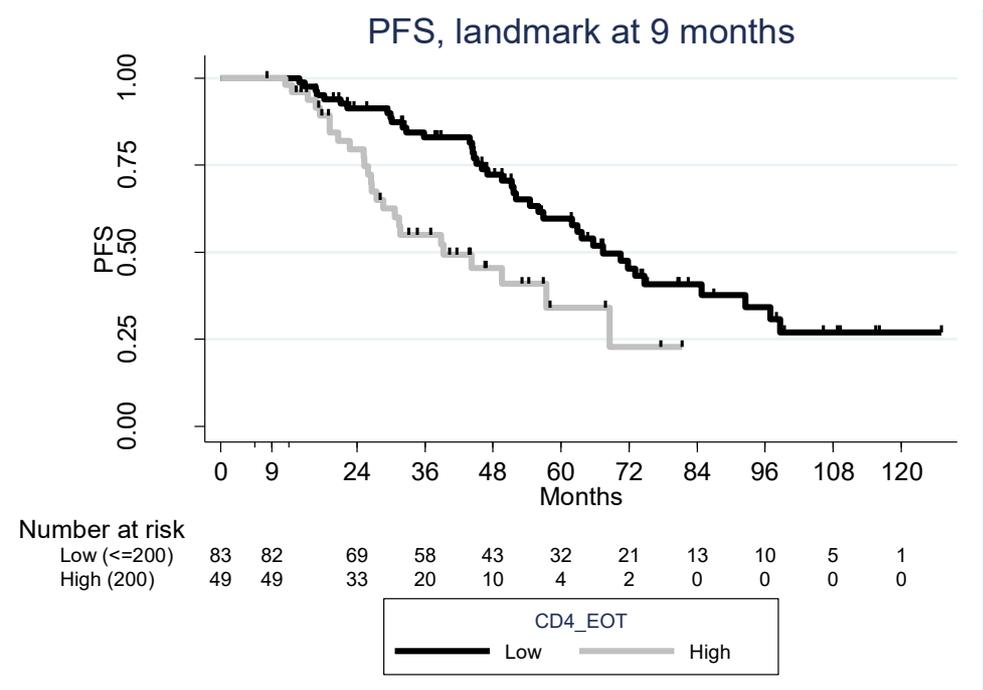
Variable	PFS à 5 ans	HR [95%CI]	p
<b>Age à J1C1</b>			
• ≤ 65 ans	55,8 %	1 (réf.)	0,829
• > 65 ans	54,4 %	1,06 [0,65 ; 1,72]	
<b>Genre</b>			
• Femme	61,8 %	1 (réf.)	0,245
• Homme	52,5 %	1,35 [0,81 ; 2,26]	
<b>Délétion 11q</b>			
• Absence	60,9 %	1 (réf.)	0,002
• Présence	35,1 %	2,19 [1,35 ; 3,56]	
<b>Délétion 17p et/ou mutation <i>TP53</i></b>			
• Absence	57,4 %	1 (réf.)	0,013
• Présence	44,4 %	3,87 [1,34 ; 11,22]	
<b>β2-microglobuline pré-RFC</b>			
• ≤ 3,5 mg/L	56,4 %	1 (réf.)	0,813
• > 3,5 mg/L	43,9 %	0,91 [0,42 ; 1,98]	
<b>Binet pré-RFC</b>			
• A	59,9 %	1 (réf.)	0,513
• B ou C	53,0 %	1,21 [0,68 ; 2,17]	
<b>Statut <i>IGHV</i></b>			
• Muté	71,7 %	1 (réf.)	0,002
• Non muté	45,8 %	2,55 [1,42 ; 4,59]	
<b>Caryotype complexe</b>			
• Absence	49,4 %	1 (réf.)	0,333
• Présence	40,6 %	1,35 [0,73 ; 2,50]	

#### 4.3.1 Analyse Landmark à 9 mois

En analyse univariée, les variables MRD en classes à EOT et CD4 à EOT étaient corrélées à la PFS : en cas de MRD à EOT basse, intermédiaire et haute on retrouvait des PFS à 5 ans de respectivement 63,7 %, 33,9 % et 15,0 % (Figure 12). En cas de CD4 à EOT supérieurs à 200/mm<sup>3</sup>, la PFS à 5 ans était de 34,1 % contre 59,6 % en-dessous de ce seuil (Figure 13, HR=2,28, p=0,002).



**Figure 12 : PFS en fonction du groupe de MRD à EOT (Landmark à 9 mois).**



**Figure 13 : PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT (Landmark à 9 mois).**

Les analyses bivariées réalisées sur les lymphocytes CD4, CD8 et NK ainsi que sur la MRD (Tableau 12) ont montré une influence de la MRD, des CD4 et des NK sur la PFS.

Le nombre de CD4 à EOT était associé à la PFS indépendamment de leur augmentation lors du suivi : pour 100 CD4/mm<sup>3</sup> supplémentaires à EOT on retrouvait une augmentation de risque de rechute de 23 % (p<0,001) ; le fait d'avoir des CD4 à EOT supérieurs à 200/mm<sup>3</sup> augmentait significativement le risque de rechute (HR=2,76, p=0,027) mais leur passage au-delà du seuil de 200/mm<sup>3</sup> aux visites suivantes n'a pas été retrouvé associé à la PFS.

Le niveau de MRD atteint à EOT et son augmentation étaient également associés avec un risque de rechute augmenté (p<0,001 chaque).

L'augmentation des NK depuis EOT était associée à la PFS indépendamment de leur chiffre à EOT, avec une augmentation de 26 % du risque de rechute pour toute augmentation de 100 NK/mm<sup>3</sup> depuis EOT.

Concernant les CD8, ni leur valeur à EOT ni leur augmentation n'étaient associées à la PFS.

Nous avons ensuite testé plusieurs modèles d'analyse multivariée en fonction de la méthode d'expression des variables MRD et CD4 et avons constamment observé un effet significatif de la MRD à EOT ainsi que de sa ré-augmentation sur la PFS. En prenant la MRD et les CD4 en tant que variables continues (Tableau 11), les variables suivantes étaient associées à la PFS : statut *IGHV* non muté (HR=2,1), CD4 EOT (pour 100 CD4/mm<sup>3</sup> supplémentaires : HR=1,30), MRD EOT (HR=1,12), Delta MRD (variable dépendante du temps, HR=1,03). Il existait une tendance à un effet délétère de la del11q (HR=1,64) et du Delta NK (variable dépendante du temps : pour une augmentation de 100 NK/mm<sup>3</sup> : HR=1,20), ainsi qu'une tendance à un effet bénéfique de l'augmentation des CD4 (variable dépendante du temps : pour une augmentation de 100 CD4/mm<sup>3</sup> : HR=0,87) sur la PFS.

**Tableau 11 : analyse multivariée - PFS à 5 ans**

Variable	HR	95%CI	p
<b>Délétion 11q</b>			
• Absence (réf.)	1		
• Présence	1,64	[0,84 ; 3,12]	0,135
<b>Satut <i>IGHV</i></b>			
• Muté (réf.)	1		
• Non muté	2,10	[1,02 ; 4,32]	0,044
<b>CD4 EOT/100</b>	1,30	[1,12 ; 1,50]	0,001
<b>Delta CD4*/100</b>	0,87	[0,75 ; 1,01]	0,062
<b>NK EOT/100</b>	1,09	[0,79 ; 1,50]	0,592
<b>Delta NK*/100</b>	1,20	[0,96 ; 1,49]	0,111
<b>MRD EOT</b>	1,12	[1,03 ; 1,21]	0,006
<b>Delta MRD*</b>	1,03	[1,01 ; 1,05]	<0,001

\* : variable dépendante du temps

**Tableau 12 : analyses bivariées pour la PFS concernant la valeur à EOT et la croissance de la MRD et des cellules immunitaires normales**

<b>Analyses bivariées (valeur à EOT et évolution)</b>			
<b>Evolution CD4 (n=132)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>CD4 EOT/100</b>	1,23	[1,12 ; 1,36]	<0,001
<b>Delta CD4*/100</b>	1,04	[0,95 ; 1,13]	0,412
<b>Evolution CD4 (classes) (n=132)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>Classes de CD4 EOT (/mm<sup>3</sup>)</b>			
• ≤ 200 (réf.)	1		
• > 200	2,76	[1,12 ; 6,79]	0,027
<b>Augmentation d'une classe depuis EOT*</b>			
• Non (réf.)	1		
• Oui	1,26	[0,52 ; 3,04]	0,605
<b>Evolution NK (n=109)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>NK EOT/100</b>	1,12	[0,82 ; 1,52]	0,477
<b>Delta NK*/100</b>	1,26	[1,04 ; 1,54]	0,019
<b>Evolution CD8 (n=132)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>CD8 EOT/100</b>	1,05	[0,96 ; 1,14]	0,286
<b>Delta CD8*/100</b>	1,00	[0,92 ; 1,07]	0,898
<b>Evolution MRD (continue) (n=131)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>MRD EOT</b>	1,13	[1,08 ; 1,19]	<0,001
<b>Delta MRD*</b>	1,04	[1,03 ; 1,05]	<0,001
<b>Evolution MRD (classes) (n=131)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>Classes de MRD EOT</b>			
• Basse (réf.)	1		
• Intermédiaire	3,25	[1,89 ; 5,60]	<0,001
• Haute	21,82	[8,47 ; 56,21]	<0,001
<b>Augmentation d'une classe depuis EOT*</b>			
• Non (réf.)	1		
• Oui	5,18	[2,72 ; 9,84]	<0,001

\* : variable dépendante du temps

4.3.1.1 Effet de CD4 EOT sur la PFS selon la MRD EOT

**En cas de MRD EOT basse**, il n’y avait pas de différence de PFS à 5 ans selon les CD4 à EOT (n=96, PFS=65,0 % si CD4 ≤ 200/mm<sup>3</sup>, PFS=59,0 % si CD4 > 200/mm<sup>3</sup>, p=0,6998, Figure 14).

**En cas de MRD EOT intermédiaire**, malgré un effectif restreint (n=34) une différence a été mise en évidence en termes de PFS entre le fait d’avoir des CD4 EOT strictement supérieurs (7,7 %) ou inférieurs ou égaux à 200/mm<sup>3</sup> (53,0 %, HR=5,03, p=0,0001, Figure 15).

**En cas de MRD EOT élevée** (n=10), le faible effectif ne permettait pas cette analyse.

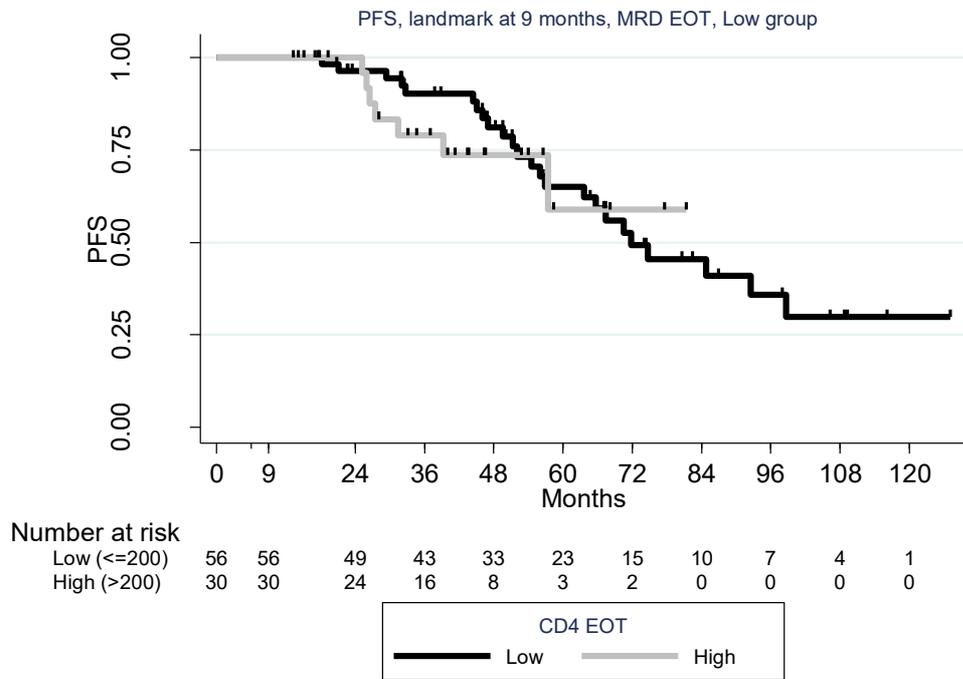


Figure 14: PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT, sous-groupe MRD EOT basse (Landmark à 9 mois)

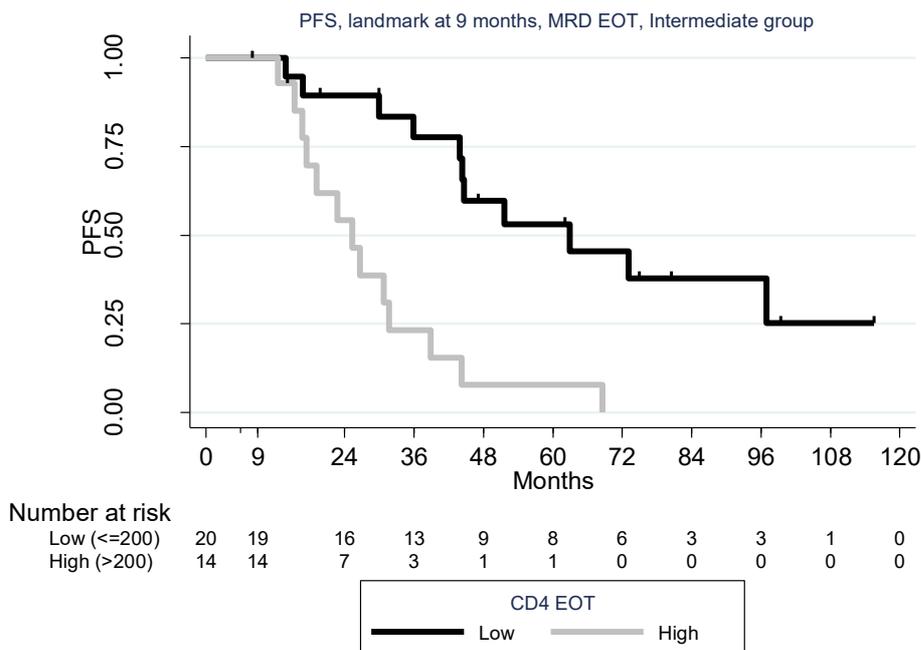


Figure 15 : PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT, sous-groupe MRD EOT int. (Landmark à 9 mois)

4.3.1.2 Effet du seuil de CD4 EOT (supérieur à 200/mm<sup>3</sup> ou non) sur la PFS selon le groupe « statut IGHV »

**En cas de statut IGHV non muté** (n=73), on retrouvait un impact significatif du nombre de CD4 EOT en termes de PFS (PFS médiane de 63,7 mois si CD4 ≤ 200/mm<sup>3</sup>, contre 30,7 mois si CD4 > 200/mm<sup>3</sup>, HR=4,09, p<0,0001, Figure 16).

**En cas de statut IGHV muté** (n=38), l'analyse montrait une tendance vers une association entre le nombre de CD4 EOT et la PFS : quand CD4 ≤ 200/mm<sup>3</sup>, la PFS à 5 ans était de 76,2 %, et de 42,78 % quand CD4 > 200/mm<sup>3</sup> (HR=2,81, p=0,0576, Figure 17).

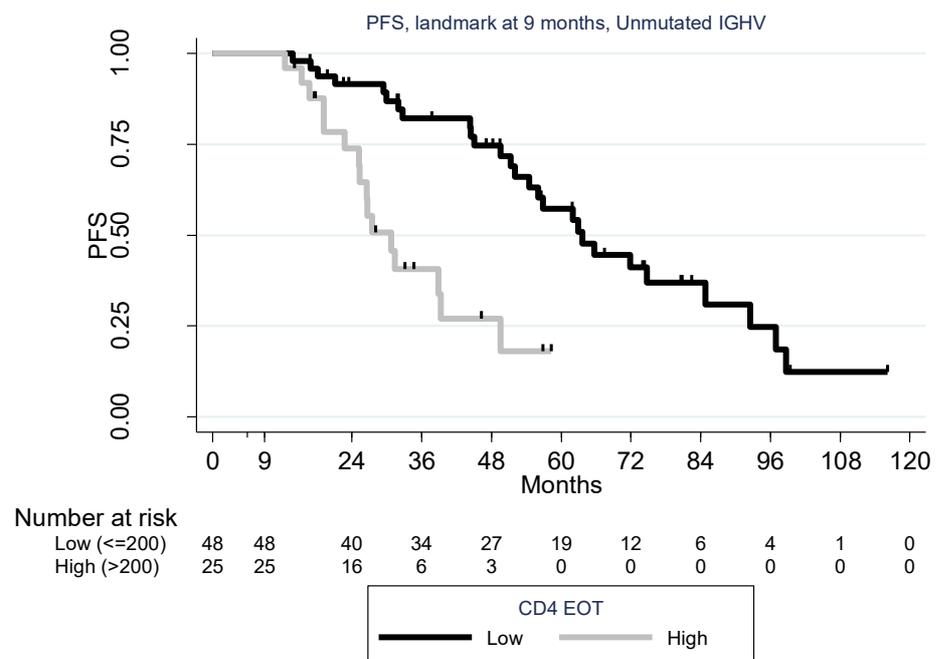


Figure 16 : PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT - sous-groupe IGHV non muté (Landmark à 9 mois)

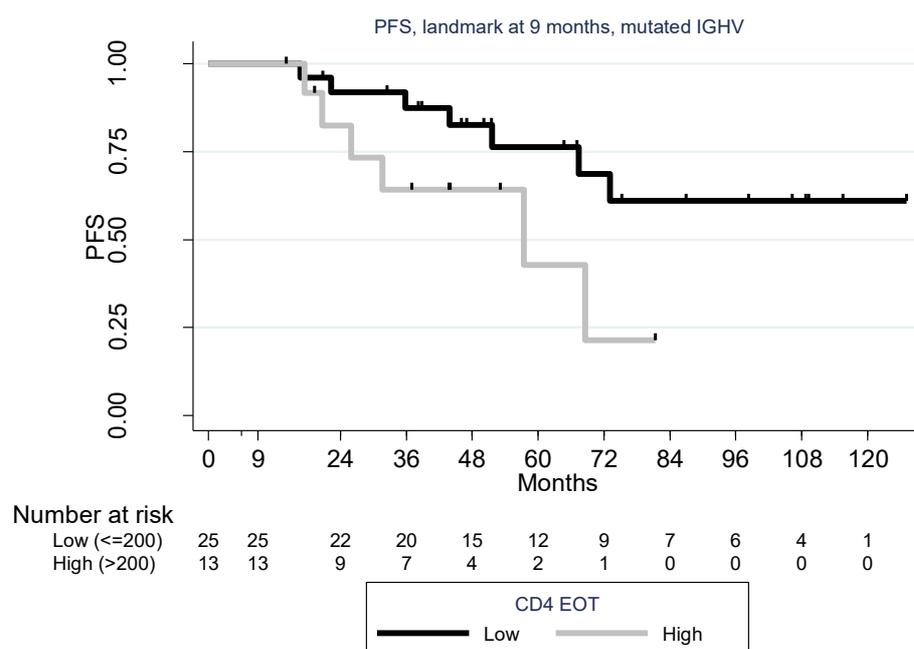


Figure 17 : PFS en fonction du groupe de CD4 à EOT - sous-groupe IGHV muté (Landmark à 9 mois)

#### 4.3.1.3 Facteurs corrélés au taux de lymphocytes T CD4 à EOT

L'analyse univariée ne retrouve que l'âge comme prédictif du nombre de CD4 EOT : alors que chez les 65 ans et moins on obtenait des CD4 EOT inférieurs ou égaux à  $200/\text{mm}^3$  dans 71,6% des cas, un tel niveau n'était atteint que chez 52,8 % des plus de 65 ans ( $p=0,022$ ). Aucune des autres variables telles que le genre ( $p=0,5716$ ), la présence d'une del11q ( $p=0,4874$ ), d'une del17p et/ou d'une mutation *TP53* ( $p=0,6685$ ), d'un caryotype complexe ( $p=0,7253$ ), d'une  $\beta 2$ -microglobuline supérieure à 3,5 mg/L ( $p=0,7588$ ), d'un statut *IGHV* non muté ( $p=0,8190$ ) ou le stade de Binet en pré-thérapeutique (A contre B ou C,  $p=0,1495$ ) n'était associée avec ce seuil de CD4 à EOT.

#### 4.3.1.4 Effet du seuil de la MRD sur la PFS selon le groupe « statut *IGHV* »

La MRD EOT catégorisée en détectable ( $\geq 10^{-4}$ ) ou non ( $< 10^{-4}$ ) était associée à la PFS quel que soit le statut mutationnel *IGHV*.

**En l'absence de mutation *IGHV*** (Figure 18) la PFS à 5 ans était de 51,2 % en cas de MRD indétectable ( $n=49$ ) contre 31,9 % en cas de MRD détectable ( $n=24$ , HR=2,03,  $p=0,0206$ ).

**En cas de mutation *IGHV*** (Figure 19) et de MRD EOT indétectable ( $n=39$ ), la PFS à 5 ans était de 87,7 % contre 35,9 % en cas de MRD détectable ( $n=73$ , HR=8,01,  $p=0,0002$ ).

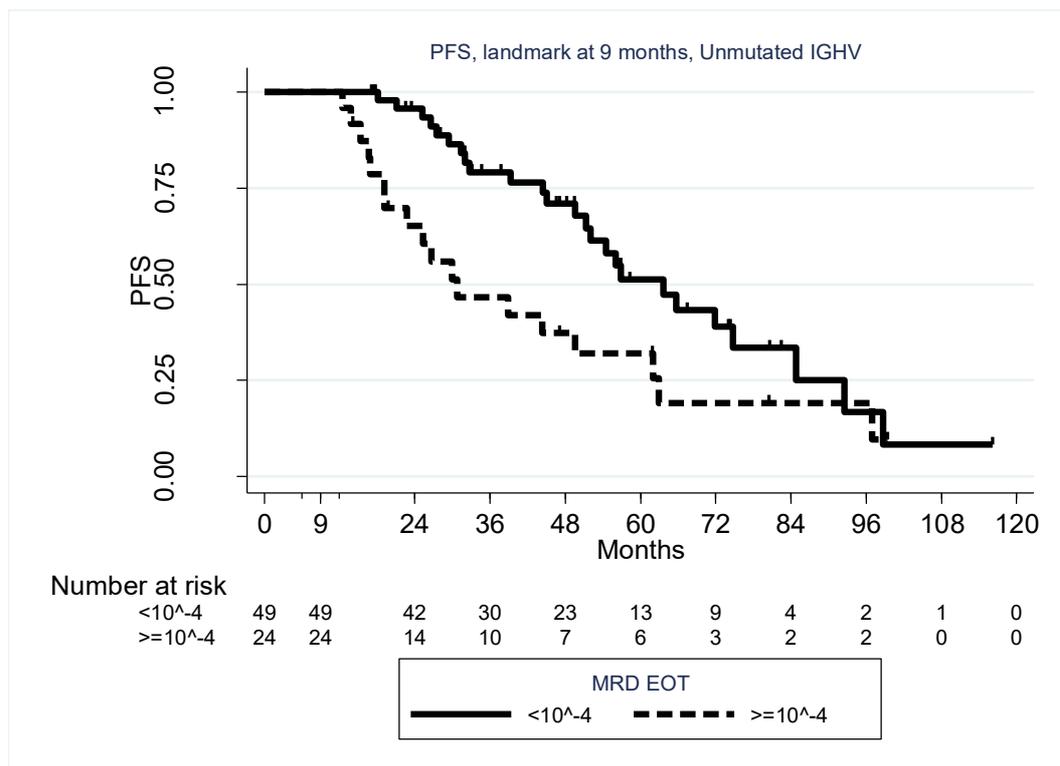
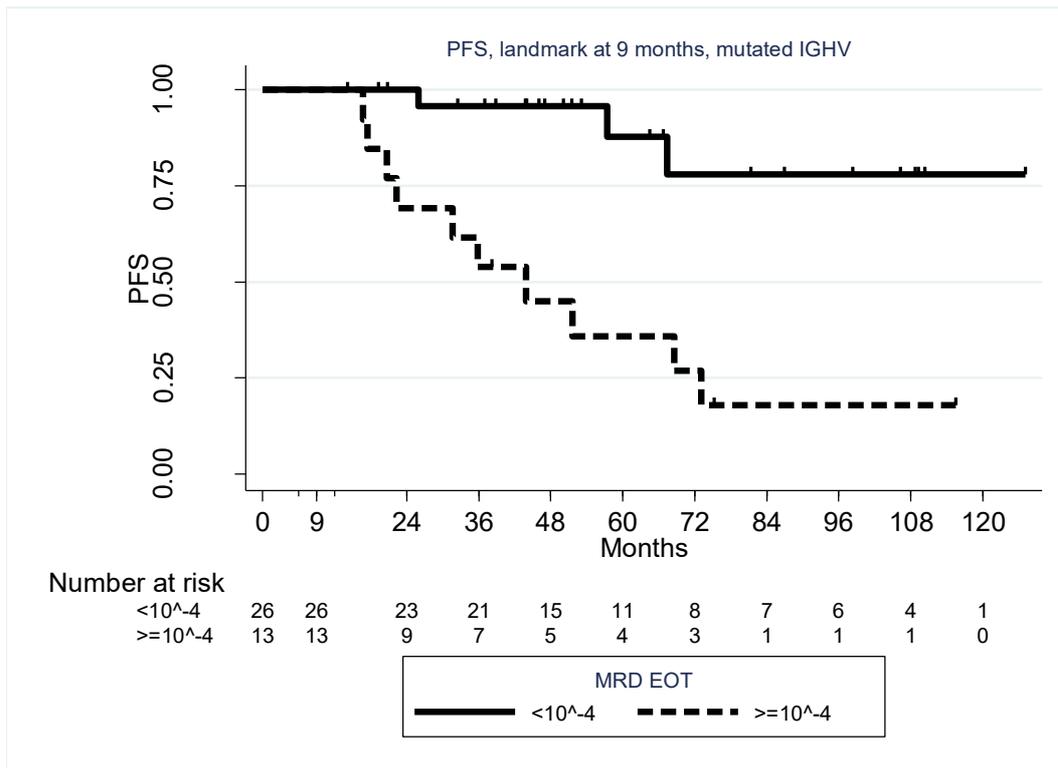


Figure 18 : PFS en fonction de la positivité de la MRD à EOT - sous-groupe *IGHV* non muté (Landmark à 9 mois).



**Figure 19 : PFS en fonction de la positivité de la MRD à EOT - sous-groupe *IGHV* muté (Landmark à 9 mois).**

#### 4.4 Survie globale – OS

Après un suivi médian de 60,5 mois, 25 patients (15,4 %) sont décédés (OS médiane non atteinte). L'OS à 5 ans est de 87,75 % (95%CI [80,34 ; 92,50]).

Le statut *IGHV* non muté était associé avec une tendance (non significative) à une OS plus courte (Tableau 13).

La MRD en tant que variable continue dépendante du temps était statistiquement associée avec l'OS (HR=1,02, p=0,003), tout comme les CD4 en tant que variable continue dépendante du temps (pour 100 CD4/mm<sup>3</sup> : HR=1,15, p=0,002).

Tableau 13 : facteurs initiaux et OS : analyse univariée

Variable	OS à 5 ans	HR [95%CI]	p
<b>Age à J1C1</b>			
• ≤ 65 ans	90,0 %	1 (réf.)	0,300
• > 65 ans	83,4 %	1,53 [0,68 ; 3,44]	
<b>Genre</b>			
• Femme	88,7 %	1 (réf.)	0,341
• Homme	87,3 %	1,56 [0,62 ; 3,92]	
<b>Délétion 11q</b>			
• Absence	88,3 %	1 (réf.)	0,286
• Présence	86,7 %	1,59 [0,68 ; 3,72]	
<b>Délétion 17p et/ou mutation TP53</b>			
• Absence	88,8 %	1 (réf.)	0,614
• Présence	100,0 %	1,69 [0,22 ; 13,07]	
<b>β2-microglobuline pré-RFC</b>			
• ≤ 3,5 mg/L	90,9 %	1 (réf.)	0,149
• > 3,5 mg/L	82,2 %	4,63 [0,58 ; 37,18]	
<b>Binet pré-RFC</b>			
• A	92,4 %	1 (réf.)	0,245
• B ou C	86,3 %	2,05 [0,61 ; 6,85]	
<b>Statut IGHV</b>			
• Muté	87,2 %	1 (réf.)	0,131
• Non muté	87,5 %	2,15 [0,80 ; 5,79]	
<b>Caryotype complexe</b>			
• Absence	89,1 %	1 (réf.)	0,381
• Présence	84,2 %	1,55 [0,58 ; 4,14]	

#### 4.4.1 Analyse Landmark à 9 mois

En analyse univariée, le fait d'avoir une MRD haute à EOT était associée à une OS à 5 ans de 59,3 % contre 91,4 % en cas de MRD basse (HR=3,96, p=0,021, Figure 20). Le fait d'avoir des CD4 à EOT supérieurs à 200/mm<sup>3</sup> n'avait pas d'influence significative sur l'OS (p=0,268, Figure 21).

Les analyses bivariées réalisées sur les lymphocytes CD4, CD8 et NK ainsi que sur la MRD (Tableau 14) ont montré que le nombre absolu de CD4 à EOT était associé à l'OS mais pas leur augmentation lors du suivi : pour 100 CD4/mm<sup>3</sup> supplémentaires à EOT on retrouvait une augmentation du risque de décès, mais le fait d'avoir des CD4 à EOT supérieurs à 200/mm<sup>3</sup> ne modifiait pas le risque de décès. L'augmentation des CD4 était associée à une tendance à une OS moins bonne à 5 ans (p=0,166).

Le niveau de MRD à EOT était associé à l'OS indépendamment de son augmentation : pour toute valeur supplémentaire de 1 % de MRD à EOT, le risque de décès était augmenté de 10%. Concernant les CD8 et les NK, ni leur valeur à EOT ni leur augmentation n'étaient associées à l'OS.

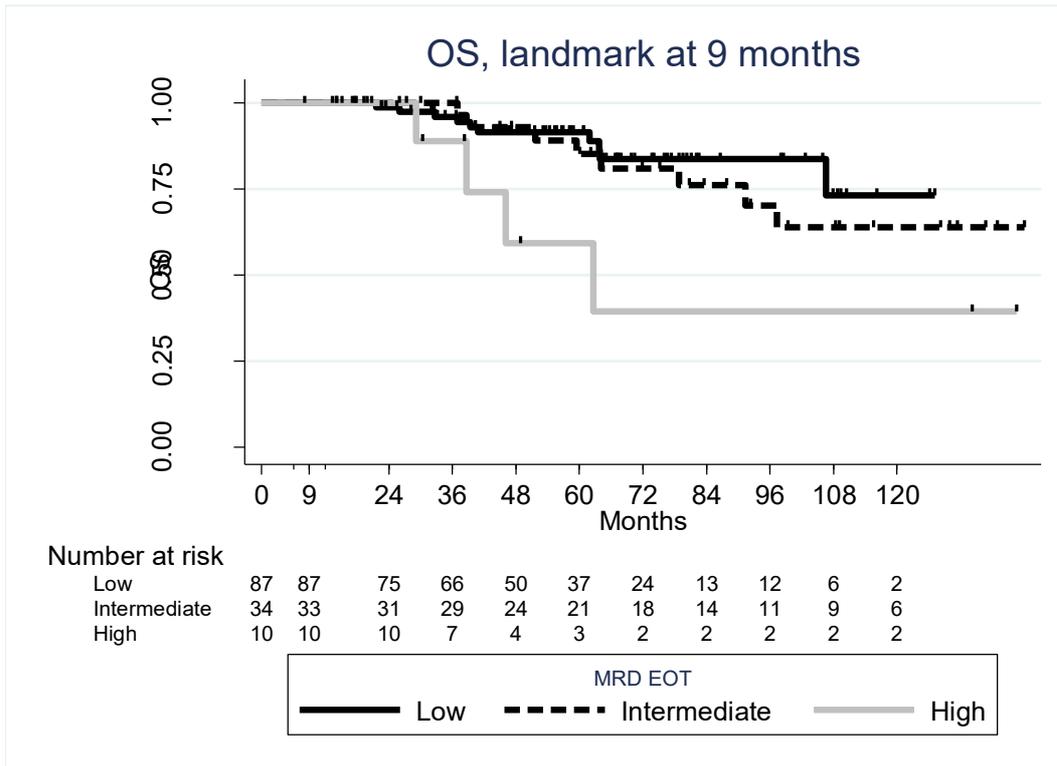


Figure 20 : OS en fonction du groupe de MRD à EOT (Landmark à 9 mois).

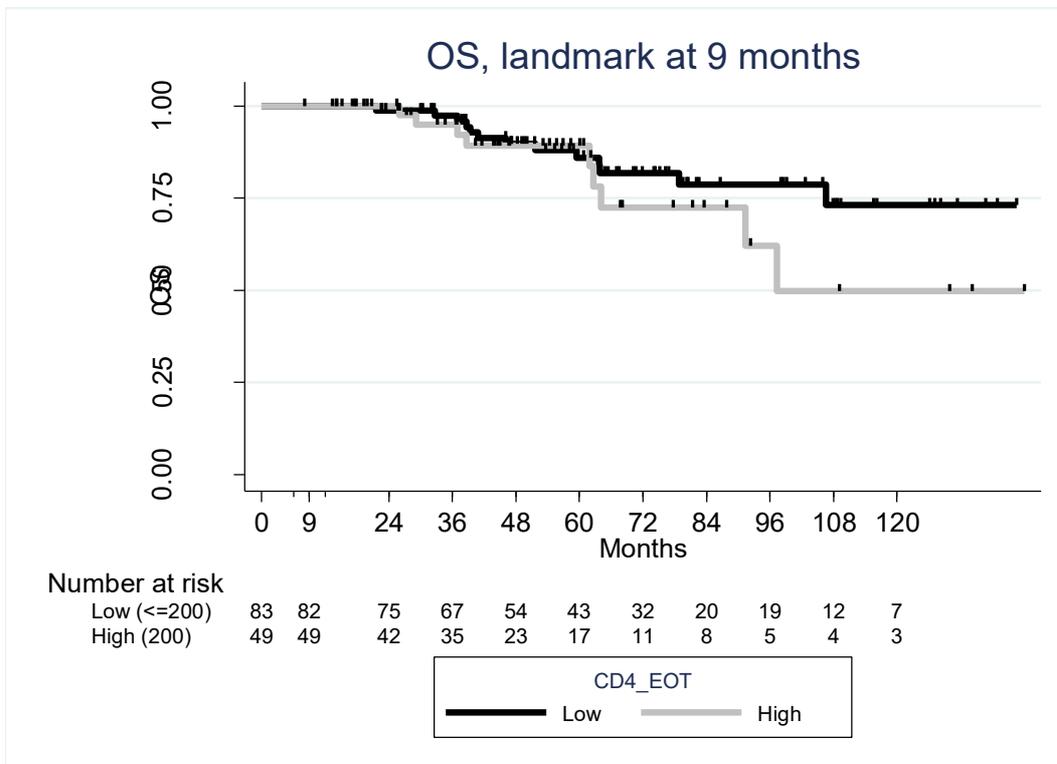


Figure 21 : OS en fonction du groupe de CD4 à EOT (Landmark à 9 mois).

**Tableau 14 : analyses bivariées pour l'OS concernant la valeur à EOT et la croissance de la MRD et des cellules immunitaires normales**

<b>Analyses bivariées (valeur à EOT et évolution)</b>			
<b>Evolution CD4 (n=132)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>CD4 EOT/100</b>	1,28	[1,10 ; 1,49]	0,001
<b>Delta CD4*/100</b>	1,09	[0,96 ; 1,24]	0,166
<b>Evolution CD4 (classes) (n=132)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>Classes de CD4 EOT (/mm<sup>3</sup>)</b>			
• ≤ 200 (réf.)	1		
• > 200	1,05	[0,29 ; 3,90]	0,937
<b>Augmentation d'une classe depuis EOT*</b>			
• Non (réf.)	1		
• Oui	0,59	[0,16 ; 2,14]	0,420
<b>Evolution NK (n=109)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>NK EOT/100</b>	0,98	[0,57 ; 1,69]	0,934
<b>Delta NK*/100</b>	0,97	[0,71 ; 1,32]	0,839
<b>Evolution CD8 (n=132)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>CD8 EOT/100</b>	1,07	[0,95 ; 1,20]	0,284
<b>Delta CD8*/100</b>	1,05	[0,95 ; 1,17]	0,361
<b>Evolution MRD (continue) (n=131)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>MRD EOT</b>	1,10	[1,05 ; 1,16]	<0,001
<b>Delta MRD*</b>	1,01	[1,00 ; 1,03]	0,074
<b>Evolution MRD (classes) (n=131)</b>			
	HR	95%CI	p
<b>Classes de MRD EOT</b>			
• Basse (réf.)	1		
• Intermédiaire	1,42	[0,55 ; 3,69]	0,470
• Haute	4,25	[1,19 ; 15,21]	0,026
<b>Augmentation d'une classe depuis EOT*</b>			
• Non (réf.)	1		
• Oui	1,14	[0,44 ; 2,99]	0,787

\* : variable dépendante du temps

De la même manière que pour la PFS, nous avons testé plusieurs modèles d'analyse multivariée en fonction de la méthode d'expression des variables MRD et CD4. Lorsque ces deux variables étaient exprimées en continu (Tableau 15), l'augmentation des CD4 depuis EOT était associée à l'OS (pour 100 CD4/mm<sup>3</sup> supplémentaires depuis EOT, augmentation du risque de décès de 30 %). La présence d'une délétion 11q, la croissance de la MRD, l'augmentation des CD4 au cours du suivi étaient associées à une tendance à l'OS raccourcie. L'augmentation des NK était associée à une tendance avec une OS prolongée.

Tableau 15 : analyse multivariée - OS à 5 ans

Variable	HR	95%CI	p
<b>Délétion 11q</b>			
• Absence (réf.)	1		
• Présence	2,41	[0,68 ; 8,59]	0,173
<b>Satut IGHV</b>			
• Muté (réf.)	1		
• Non muté	1,51	[0,43 ; 5,33]	0,524
<b>CD4 EOT/100</b>	1,22	[0,99 ; 1,51]	0,066
<b>Delta CD4*/100</b>	1,30	[1,03 ; 1,63]	0,025
<b>MRD EOT</b>	1,04	[0,96 ; 1,12]	0,364
<b>Delta MRD*</b>	1,02	[1,00 ; 1,04]	0,087
<b>NK EOT/100</b>	0,96	[0,53 ; 1,76]	0,905
<b>Delta NK*/100</b>	0,67	[0,45 ; 1,00]	0,051

\* : variable dépendante du temps

#### 4.5 Autres événements d'intérêt (cancers, infections graves et opportunistes)

Vingt patients (12,3 %) ont développé un second cancer pendant le suivi, avec un délai médian de 40,8 mois depuis le début du RFC (16,5 à 110,9 mois).

Durant le suivi, 35 patients (25,5 %) ont présenté au moins une infection opportuniste avec un délai médian de 14,2 mois depuis le début du RFC (de 2,2 à 93,8 mois).

Vingt-trois patients (16,8 %) ont eu au moins une hospitalisation pour infection, le délai médian de survenue étant de 18,3 mois depuis le début du RFC (2,2 à 112,2 mois).

#### 4.6 Traitements ultérieurs

Parmi les patients ayant rechuté, 52 (74,3 %) ont eu un traitement de deuxième ligne. Les traitements de rechute ont été Rituximab-Bendamustine (RB, 46,2 %), ibrutinib (15,4 %), R-Idélalisib, Rituximab-Cyclophosphamide-Dexaméthasone, R-Cyclophosphamide-Doxorubicine-Vincristine-Prednisone (RCD, RCHOP, 7,7 % chaque), Gemcitabine-Alemtuzumab (3,8 %), Bendamustine-Ofatumumab-Méthylprednisolone (BOMP), Dexaméthasone-Alemtuzumab, Ofatumumab seul, Alemtuzulab seul, R-Prednisone, RB-Idélalisib (1,9 % chaque).

Durant le suivi, un traitement par Ibrutinib, Idélalisib et Venetoclax a été mis en place chez 17,3 %, 6,8 % et 1,9 % des patients, respectivement. Deux patients ont été allogreffés (1,2 %) à 3,2 et 4,9 ans de la dernière cure de RFC, et l'un d'entre eux est encore en vie à 4 ans et demi de l'allogreffe.

## 5 Discussion

### 5.1 Résultats principaux : comparaison avec les essais historiques

Dans cette étude, nous rapportons les données de maladie résiduelle de 162 patients ayant reçu du RFC en première ligne de LLC. L'âge médian de nos patients avant RFC était de 61,5 ans, ce qui est semblable aux études de phase 3 ayant testé cette association en première ligne (114,146), un peu plus âgé que dans l'étude initiale du MDACC (159). Les caractéristiques patients et les facteurs de risque classiquement associés à la LLC étaient retrouvés à des fréquences très comparables dans notre cohorte également. Par contre, nos patients avaient très majoritairement une  $\beta$ 2-microglobuline élevée, cependant peu de patients disposaient de ce dosage, rendant toute interprétation difficile.

Les patients étaient majoritairement en RC/RCi à l'issue de l'ICT, reçue pour 6 cures chez plus de 75 % d'entre eux. La majorité des patients obtenait également une MRD indétectable, et seuls 7,5 % avaient une MRD haute à l'issue du RFC. Les patients demeuraient lymphopéniques lors du suivi, et la médiane de CD4 à EOT était de  $153,5/\text{mm}^3$ , ce qui se traduisait par des CD4 inférieurs ou égaux à  $200/\text{mm}^3$  chez 64,2 % des patients. Le suivi médian est de 60,5 mois. La PFS est de 53,7 % à 5 ans, avec une estimation de PFS médiane de 65,7 mois (95%CI [54,5-74,7 mois]).

Ainsi nous obtenons un meilleur taux d'éradication de la MRD que dans l'essai CLL8. De même nous obtenons une PFS médiane de 65,7 mois contre 52 mois dans l'essai CLL8 et 57,6 mois dans l'essai CLL10 (bras RFC). Un facteur pouvant expliquer cette différence assez modeste est le faible nombre de patients de notre série qui présentaient une délétion 17p et/ou une mutation de *TP53* (7 à 10 % de délétion 17p dans CLL8 contre 3,9 % dans notre série, alors que dans CLL10 les del17p étaient exclues) ; en effet, les patients de Midi-Pyrénées présentant une anomalie de *TP53* se voyaient plutôt orienter vers un traitement à base d'alemtuzumab ou d'ibrutinib (selon l'année de traitement). Les réponses selon IWCLL peuvent également être meilleures car nous ne pratiquons pas de biopsie ostéomédullaire et affirmons la RC sans cet examen. En ce qui concerne la PFS, le suivi en vie réelle ne permettait probablement pas d'observer la rechute aussi rapidement que ne l'a fait le suivi standardisé des essais cliniques, ce qui peut participer à la différence observée.

En analyse univariée une del11q, une del17p et/ou une mutation de *TP53* et un statut *IGHV* non muté étaient associés à une PFS raccourcie, ce qui est classique. La valeur de CD4 et de MRD à EOT ainsi que la croissance de la MRD et du nombre de NK (indépendamment de leur valeur à EOT) étaient également associées à une PFS raccourcie. En analyse multivariée les CD4 à EOT, la MRD à EOT, la croissance de MRD et la présence d'un statut *IGHV* non muté étaient associés défavorablement à la PFS. Par contre, nous n'avons pas de résultat concernant la dose intensité du RFC, un paramètre reconnu comme pronostique pour la PFS et l'OS (154). De façon intéressante, la mesure du taux de CD4 permettait dans certains sous-groupes de patients d'affiner l'information pronostique apportée par la mesure de la MRD, voire d'être plus informative. Par exemple chez les patients *IGHV* non mutés, la présence de plus ou de moins de  $200 \text{ CD4}/\text{mm}^3$  à EOT était associée à la PFS de manière plus forte que ne l'était la MRD (détectable contre négative). Pour la vaste majorité des centres traitant des LLC en France, sans mesure de MRD en routine, cette donnée méritera confirmation.

L'OS à 5 ans est de 87,8 %, et l'OS médiane n'est pas atteinte. En analyse bivariée, les CD4 et la MRD à EOT sont associés défavorablement à l'OS alors qu'en analyse multivariée l'augmentation des CD4 depuis EOT est défavorablement associée à l'OS.

Nous confirmons les résultats d'études précédentes concernant la valeur pronostique indépendante de la MRD après ICT dans la LLC, en termes de PFS et d'OS dans des populations différentes (types de chimiothérapies/ICT, première ligne ou plus, patients inclus ou non dans des essais cliniques) (96,116,147,149,154). Comme dans l'étude CLL8, les seuils de  $10^{-4}$  et de  $10^{-2}$  permettent d'individualiser 3 groupes pronostiques distincts en termes de PFS, alors que seul le seuil de  $10^{-2}$  est associé à l'OS ; les courbes de survie (PFS et OS) sont superposables à celles publiées en 2012 lors de l'analyse des données de MRD de cet essai (96). Nous confirmons également la valeur pronostique de la croissance de la MRD en termes de PFS dans ce contexte d'ICT, comme cela a été rapporté à plusieurs reprises avec des méthodologies différentes. Nous retrouvons notamment une valeur pronostique de la croissance de la MRD indépendante de la MRD EOT, comme ceci a été observé dans l'étude CLL8 (17).

Notre échantillon a une excellente PFS à 5 ans de 87,7 % avec un plateau sur la courbe de survie en cas de MRD négative et de statut *IGHV* muté, ce qui est cohérent avec les données à long terme de la cohorte du MDACC dans laquelle on voit apparaître un plateau sur la courbe de PFS des patients *IGHV* mutés, se traduisant par une PFS de 53,9 % à 12,8 ans (quasiment 80 % en cas de MRD EOT négative) (113). Cependant, ne pas obtenir d'éradication de la MRD chez les sujets *IGHV* mutés contrebalance cette donnée optimiste avec une médiane de rechute de 3 ans, ce qui rend ces rechutes « à risque » selon les définitions internationales (éligibles à des thérapies ciblées plutôt qu'à une reprise de l'ICT). L'OS à 5 ans est de 87,8 %, et l'OS médiane n'est pas atteinte. En analyse bivariée, les CD4 et la MRD à EOT sont associés défavorablement à l'OS alors qu'en analyse multivariée l'augmentation des CD4 depuis EOT est défavorablement associée à l'OS.

## 5.2 Rôle putatif de la reconstitution immunitaire normale sur la rechute de la MRD

Notre étude montre que le nombre absolu de CD4 à EOT était associé à la PFS et à l'OS après RFC dans la LLC, indépendamment de leur augmentation au cours du suivi. Le seuil de 200 CD4/mm<sup>3</sup> à EOT semble aussi bien discriminer les patients *IGHV* non mutés en termes de PFS que ne le fait l'étude de la maladie résiduelle. En analyse multivariée, un nombre élevé de CD4 à EOT gardait un impact pronostique péjoratif en termes de PFS, avec une tendance à une OS réduite. De façon surprenante dans les modèles multivariés, l'augmentation des CD4 au cours du suivi se traduisait par une OS moins bonne malgré une tendance à une meilleure PFS.

La prolifération des cellules B de LLC nécessite le contact avec un antigène mais aussi et surtout le contact avec CD40L et la présence de cytokines de type Th2, ces deux derniers éléments étant rendus possibles par la présence de lymphocytes T CD4 essentiellement. Il a été montré dans certains modèles murins que l'infiltration des centres prolifératifs par les lymphocytes CD4 pouvait favoriser la croissance tumorale (42), et les lymphocytes CD4 des patients de LLC sont constitués d'une proportion élevée de lymphocytes T régulateurs aux propriétés suppressives importantes (41,57). La persistance de lymphocytes T CD4 en post-thérapeutique pourrait donc aider à la croissance tumorale lorsqu'il reste une masse tumorale non négligeable (essentiellement en cas de MRD intermédiaire, sous-groupe dans lequel nous retrouvons un effet pronostique plus important des CD4 à EOT). Cette

hypothèse nécessite d'accepter *a priori* que le nombre de lymphocytes T CD4 circulants est corrélé au nombre de lymphocytes T CD4 présents dans les centres prolifératifs, ce qui peut sembler logique si l'on part du principe que les lymphocytes T sont attirés vers les centres prolifératifs *via* des gradients cytokiniques (qui s'ils sont susceptibles d'être modifiés par la présence de cellules tumorales résiduelles, pourraient persister lorsque la MRD reste détectable). Enfin, cette hypothèse serait cohérente avec l'impact plus important du taux de lymphocytes T CD4 en fin de traitement sur la PFS dans le sous-groupe des LLC *IGHV* non muté (maladies présentant une plus grande propension à proliférer).

Le seul facteur associé à la lymphopénie CD4 inférieure ou égale à  $200/\text{mm}^3$  à EOT était un âge jeune. Les patients les plus âgés étant plus susceptibles de voir leurs doses de cytotoxiques diminuées (après toxicité par exemple), il pourrait être supposé que le fait d'avoir des CD4 à EOT inférieurs ou égaux à  $200/\text{mm}^3$  pourrait n'être que le reflet d'une plus grande exposition médicamenteuse. Il serait cependant étonnant en suivant ce raisonnement de constater que ni la concentration des lymphocytes CD8 ni celle des lymphocytes NK à EOT n'ont d'impact pronostique. De plus, dans notre étude prospective FORTIS, le niveau de dose-intensité du RFC (plus ou moins de 80 % de la théorique) ne corrèle pas avec le niveau de CD4 post-traitement.

La valeur des NK à EOT n'a aucune valeur pronostique, mais le modèle bivarié intégrant leur concentration à EOT et leur variation montre que leur augmentation est associée à une PFS amoindrie (mais cet effet disparaît en analyse multivariée). De façon inverse, il existait dans l'analyse multivariée pour l'OS une tendance forte en faveur d'un effet bénéfique de l'augmentation des NK au cours du suivi, ce qui peut s'expliquer par la restauration de l'activité anti-infectieuse mais également anti-tumorale médiée par ce sous-type cellulaire. Il se pourrait que les patients reconstituant plus rapidement leurs lymphocytes NK présentent moins d'infections graves et de seconds cancers, mais le faible effectif de la présente étude n'est pas suffisant pour mettre en évidence un tel effet.

Dans tous les cas, ces hypothèses doivent s'interpréter au vu des niveaux de MRD. En effet des données obtenues au laboratoire démontrent trois points importants entre EOT et un an post-RFC :

- Les NK sont efficaces en lyse autologue (avec IL2+rituximab) uniquement si la MRD reste stable (155),
- Les T CD8 chargés de granzyme B sont plus fréquemment observés si la MRD augmente (ici par définition ils ne peuvent contrôler cette augmentation de MRD),
- Les T CD4 augmentés avec une MRD haute à un an ont un phénotype Treg (CD25+, FoxP3+, CD62L+) et pourraient expliquer que les NK et/ou les T CD8 ne soient pas efficaces.

### 5.3 Forces et limites de l'étude

Avec le réseau Oncomip, les décisions thérapeutiques prises en RCP d'hématologie maligne en Midi-Pyrénées sont centralisées. Ce mode de fonctionnement permet de proposer systématiquement une consultation de suivi sur le CHU/l'IUC après les ICT d'induction, et assure un recrutement quasi-exhaustif sur l'ensemble de la région.

Le suivi de la MRD n'est pas recommandé en routine (2), et si cet examen permet de se substituer à la PFS dans le cadre d'essais cliniques, il existe peu de données d'utilisation en vie réelle de la MRD (149). Cette étude permet de confirmer l'impact pronostique majeur de la MRD dans la LLC hors des essais cliniques, que ce soit une mesure unique en fin de traitement ou en termes de dynamique sur un suivi régulier.

Très peu d'études portent sur la valeur pronostique des cellules immunitaires normales et sur leur influence sur la croissance de la MRD ou la rechute. Si certains facteurs intrinsèques à la maladie ont été corrélés avec une croissance de MRD plus rapide (absence de mutation *IGHV* notamment) (17), il s'agit à notre connaissance d'un des seules études s'intéressant à l'influence des cellules normales sur la dynamique de reconstitution de la MRD, ainsi que sur la PFS. Les implications pratiques suivantes peuvent être proposées : les patients *IGHV* mutés doivent être plus fréquemment surveillés si leur taux de CD4 est élevé post-RFC ; si l'on souhaite sélectionner des patients pour une étude de consolidation post-RFC, il faut mesurer la MRD mais aussi la valeur de CD4 à EOT.

Cette étude présente également des limites dont la plupart sont inhérentes à son caractère rétrospectif. Les comorbidités des patients ainsi que leur état général n'étaient que rarement connus, alors que le traitement par RFC est très toxique et que l'état général du patient est pronostique en pré-thérapeutique (87). De même, nous n'avons pas de données sur l'exposition médicamenteuse, alors que l'intensité de dose est corrélée à la PFS dans la LLC (154).

Bien que la perte de *TP53* (par del17p ou mutation inactivatrice) soit un facteur pronostique très puissant dans cette maladie, nous n'avons pas intégré la variable 'délétion 17p et/ou mutation *TP53*' dans les modèles multivariés. En effet seuls 74 avaient eu une recherche de mutation *TP53* et leur inclusion aurait drastiquement diminué la taille de notre échantillon.

La même réflexion est faite concernant la  $\beta$ 2-microglobuline qui a une valeur pronostique importante dans les modèles établis sur des données de chimiothérapie/ICT (72,87) et qui n'était disponible que pour 69 patients. Ceci n'a pas permis de retrouver d'impact pronostique de ce marqueur dont la valeur en pré-thérapeutique permet pourtant de préciser la PFS des patients traités par RFC au MDACC (en définissant des groupes selon le statut mutationnel *IGHV* puis selon la valeur de  $\beta$ 2-microglobuline (113)).

L'expression de la croissance de la MRD (Delta MRD) aurait probablement été plus adaptée en tant que rapport qu'en tant que soustraction (croissance proportionnelle à la maladie résiduelle pré-existante), mais un rapport était techniquement impossible de par la présence de patients ayant une MRD indétectable à EOT (impossibilité de diviser par zéro). Dans un souci d'homogénéité, nous avons exprimé l'ensemble des Delta sous la forme de soustractions. De plus, afin de pallier ce potentiel biais, nous avons (i) étudié les variables Delta en tant que variables dépendantes du temps (intégration d'un dénominateur temps), (ii) vérifié par des modèles bivariés que la valeur pronostique de chaque Delta était indépendante du niveau de la variable concernée à EOT (Tableau 12, Tableau 14) et (iii) exprimé la croissance de MRD par le changement de classe de MRD.

Certains patients ont été perdus de vue, ce qui limite l'interprétation des données et a pu empêcher certaines analyses statistiques. Nous avons tenté de pallier ce manque en faisant appel aux médecins des patients (médecins des centres ayant pris en charge le patient, médecin traitant) ainsi qu'aux patients eux-mêmes.

#### 5.4 Perspectives

L'implication des CD4 dans le fonctionnement du lenalidomide rend son utilisation en maintenance particulièrement séduisante, d'autant que les indications d'une telle maintenance actuellement explorées recoupent les sous-groupes où la valeur de CD4 était la plus discriminante sur le plan pronostique dans notre étude (statut *IGHV* non muté, MRD

délectable). Notons pour mémoire que 91 % des patients recevant ce médicament dans l'essai CLLM1 étaient *IGHV* non mutés (131).

## 6 Conclusion

Nous avons réalisé une étude portant sur 162 patients de vie réelle traités à Toulouse et Bordeaux par RFC en première ligne de LLC, et pour lesquels un suivi de la reconstitution immunitaire et de la maladie résiduelle (MRD, dans le sang) était disponible. Nous retrouvons des taux de réponse et de taux d'éradication de la MRD, ainsi que des durées de survies, cohérents avec les données d'études cliniques randomisées, suggérant que ce traitement est bien un standard en première ligne.

L'analyse de survie sans progression (PFS) retrouve les facteurs pronostiques classiquement décrits (délétion 11q, délétion 17p/mutation *TP53*, statut *IGHV* non muté). Notre analyse multivariée retrouve la valeur pronostique péjorative de la MRD en fin de traitement, ainsi que de son augmentation au cours du suivi. Elle retrouve également un impact pronostique défavorable de la valeur absolue des lymphocytes T CD4 en fin de traitement, cet effet étant retrouvé dans les sous-groupes de patients *IGHV* non mutés ou présentant une maladie résiduelle détectable en fin de traitement, ce qui peut aider à préciser la durée de PFS dans ces sous-groupes.

L'analyse univariée des facteurs associés à la survie globale retrouve l'importance d'éradiquer la MRD, mais également l'apport prédictif de la mesure du taux de lymphocytes T CD4 en fin de traitement. En analyse multivariée, l'augmentation des CD4 confère un désavantage en termes de survie globale.

La mesure de la MRD étant habituellement recherchée par cytométrie de flux dans le sang, une numération des lymphocytes T CD4 ne nécessite pas de prélèvement supplémentaire, et peut plus facilement être obtenue dans de nombreux hôpitaux. Tous ces éléments sont autant d'arguments pour proposer une maintenance aux patients présentant des lymphocytes T CD4 élevés après RFC (>200/mm<sup>3</sup>).

*Vu permis d'imprimer*  
*Le Doyen de la Faculté*  
*de Médecine Toulouse - Purpan*



**Didier CARRIÉ**



Professeur Christian RECHER  
RPPS : 10002811880  
Département d'Hématologie  
I. U. C. T - O. 1 avenue Irène Joliot-Curie  
31059 TOULOUSE Cedex 9  
Tel. 05 31 15 61 89

## 7 Références bibliographiques

1. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3724–34.
2. 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.
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90.
4. Li Y, Wang Y, Wang Z, Yi D, Ma S. Racial differences in three major NHL subtypes: descriptive epidemiology. *Cancer Epidemiol*. 2015 Feb;39(1):8–13.
5. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2009 May;94(5):647–53.
6. Cerhan JR, Slager SL. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood*. 2015 Nov 12;126(20):2265–73.
7. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):78–85.
8. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primer*. 2017 19;3:16096.
9. Baumann Kreuziger LM, Tarchand G, Morrison VA. The impact of Agent Orange exposure on presentation and prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014 Jan;55(1):63–6.
10. Schinasi LH, De Roos AJ, Ray RM, Edlefsen KL, Parks CG, Howard BV, et al. Insecticide exposure and farm history in relation to risk of lymphomas and leukemias in the Women's Health Initiative observational study cohort. *Ann Epidemiol*. 2015 Nov;25(11):803–10.
11. Morton LM, Slager SL, Cerhan JR, Wang SS, Vajdic CM, Skibola CF, et al. Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2014 Aug;2014(48):130–44.
12. 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.
13. 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.
14. Ouillette P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*. 2008 Feb 15;68(4):1012–21.
15. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavoraro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012 Mar;97(3):437–41.
16. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, Oldreive C, Davis Z, Richards S, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Dec 20;30(36):4524–32.

17. Boettcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch R, Fingerle-Rowson GR, et al. Minimal Residual Disease (MRD) Re-Growth Kinetics Are An Independent Predictor for Progression Free Survival (PFS) in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Are Related to Biologically Defined CLL-Subgroups– Results From the CLL8 Trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood*. 2011 Nov 18;118(21):1777–1777.
18. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Apr 3;123(14):2139–47.
19. Haferlach C, Dicker F, Weiss T, Schnittger S, Beck C, Grote-Metke A, et al. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010 Sep;49(9):851–9.
20. Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, Altmüller J, Thiele H, Bahlo J, et al. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*. 2016 Jul 21;128(3):395–404.
21. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014 Mar;89(3):249–55.
22. Kreuzer K-A, Furman RR, Stilgenbauer S, Dubowy RL, Kim Y, Munugalavada V, et al. Outcome of Patients with Complex Karyotype in a Phase 3 Randomized Study of Idelalisib Plus Rituximab for Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):192–192.
23. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, Ferrajoli A, Stingo F, Smith SC, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*. 2015 Oct 15;121(20):3612–21.
24. O'Brien SM, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger J, Blum K, et al. Five-Year Experience with Single-Agent Ibrutinib in Patients with Previously Untreated and Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):233–233.
25. 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.
26. DE Braekeleer M, Tous C, Guéganic N, LE Bris M-J, Basinko A, Morel F, et al. Immunoglobulin gene translocations in chronic lymphocytic leukemia: A report of 35 patients and review of the literature. *Mol Clin Oncol*. 2016 May;4(5):682–94.
27. Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C, Grelier A, Luquet I, Radford-Weiss I, et al. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res*. 2011;1(1):13–21.
28. Martín-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W, Michaux L, Callet-Bauchu E, Berger F, et al. A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1532–44.
29. Huh YO, Lin KI-C, Vega F, Schlette E, Yin CC, Keating MJ, et al. MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(1):36–44.
30. Put N, Van Roosbroeck K, Konings P, Meeus P, Brusselmans C, Rack K, et al. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol*. 2012 Jun;91(6):863–73.
31. Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, Russo Rossi A, De Angeli C, Tiseo R, et al.

- Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol*. 2008 Aug;142(4):529–37.
32. Guièze R, Robbe P, Clifford R, de Guibert S, Pereira B, Timbs A, et al. Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood*. 2015 Oct 29;126(18):2110–7.
  33. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014 May 22;123(21):3247–54.
  34. Pozzo F, Bittolo T, Arruga F, Bulian P, Macor P, Tissino E, et al. NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia*. 2016 Jan;30(1):182–9.
  35. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015 Apr;29(4):877–85.
  36. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016 Apr 28;127(17):2122–30.
  37. 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 U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524–9.
  38. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):563–74.
  39. Filip AA, Ciseł B, Koczkodaj D, Wąsik-Szczepanek E, Piersiak T, Dmoszyńska A. Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells Mol Dis*. 2013 Apr;50(4):263–70.
  40. Lad DP, Varma S, Varma N, Sachdeva MUS, Bose P, Malhotra P. Regulatory T-cell and T-helper 17 balance in chronic lymphocytic leukemia progression and autoimmune cytopenias. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(8):2424–8.
  41. Lad D, Hoeppli R, Huang Q, Garcia R, Xu L, Toze C, et al. Regulatory T-cells drive immune dysfunction in CLL. *Leuk Lymphoma*. 2017 Jun 2;1–4.
  42. Bagnara D, Kaufman MS, Calissano C, Marsilio S, Patten PEM, Simone R, et al. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*. 2011 May 19;117(20):5463–72.
  43. Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol*. 2010 Dec;20(6):431–8.
  44. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, Le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 2008 Jul;118(7):2427–37.
  45. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Oct 20;118(16):4313–20.
  46. Dühren-von Minden M, 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.
  47. Preuss K-D, Fadle N, Regitz E, Kemele M, Wölfle M, Stilgenbauer S, et al. Identification of the Antigenic Targets of the Major CLL-Derived Stereotyped BCRs and First Demonstration of Sub-Subsets. *Blood*. 2014 Dec 6;124(21):298–298.
  48. Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan X-J, Yancopoulos S, Hayes G, et al. Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently

- born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med Camb Mass*. 2011;17(11–12):1374–82.
49. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton L-A, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Res*. 2014 Aug 15;74(16):4211–6.
  50. Moreira J, Rabe KG, Cerhan JR, Kay NE, Wilson JW, Call TG, et al. Infectious complications among individuals with clinical monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): a cohort study of newly diagnosed cases compared to controls. *Leukemia*. 2013 Jan;27(1):136–41.
  51. Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. *Haematologica*. 2011 May;96(5):752–61.
  52. Patten PEM, Buggins AGS, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 2008 May 15;111(10):5173–81.
  53. Pizzolo G, Chilosi M, Ambrosetti A, Semenzato G, Fiore-Donati L, Perona G. Immunohistologic study of bone marrow involvement in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1983 Dec;62(6):1289–96.
  54. Piper KP, Karanth M, McLarnon A, Kalk E, Khan N, Murray J, et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 2011 Nov;166(2):154–63.
  55. Riches JC, Gribben JG. Immunomodulation and immune reconstitution in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*. 2014 Jul;51(3):228–34.
  56. Purroy N, Wu CJ. Coevolution of Leukemia and Host Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Apr 3;7(4).
  57. Rissiek A, Schulze C, Bacher U, Schieferdecker A, Thiele B, Jacholkowski A, et al. Multidimensional scaling analysis identifies pathological and prognostically relevant profiles of circulating T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. 2014 Nov 15;135(10):2370–9.
  58. Jain P, Javdan M, Feger FK, Chiu PY, Sison C, Damle RN, et al. Th17 and non-Th17 interleukin-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: delineation, distribution, and clinical relevance. *Haematologica*. 2012 Apr;97(4):599–607.
  59. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Aug 16;20(2):246–59.
  60. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016 Mar;16(3):145–62.
  61. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):525–30.
  62. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015 Oct 22;526(7574):519–24.
  63. Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton’s tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014 Jun 12;370(24):2286–94.
  64. Fresquet V, Rieger M, Carolis C, García-Barchino MJ, Martínez-Climent JA. Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *Blood*. 2014 Jun 26;123(26):4111–9.
  65. Sutton L-A, Rosenquist R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica*. 2015 Jan;100(1):7–

- 16.
66. Lazarian G, Guièze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Mar 20;35(9):984–93.
67. 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.
68. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1840–7.
69. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Agathangelidis A, Baliakas P, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia*. 2017 Jul;31(7):1477–81.
70. Sutton L-A, Rosenquist R. The complex interplay between cell-intrinsic and cell-extrinsic factors driving the evolution of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2015 Oct;34:22–35.
71. Langerak AW, Davi F, Ghia P, Hadzidimitriou A, Murray F, Potter KN, et al. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia*. 2011 Jun;25(6):979–84.
72. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016 Jun;17(6):779–90.
73. Sutton L-A, Young E, Baliakas P, Hadzidimitriou A, Moysiadis T, Plevova K, et al. Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica*. 2016 Aug;101(8):959–67.
74. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2262–4.
75. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, Rassenti LZ, Keating MJ, Wierda WG, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood*. 2008 May 15;111(10):5101–8.
76. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Söderberg O, Karlsson K, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4952–7.
77. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Minga E, Tsanousa A, et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood*. 2015 Jan 29;125(5):856–9.
78. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol*. 2014 Nov;1(2):e74-84.
79. Stamatopoulos B, Timbs A, Bruce D, Smith T, Clifford R, Robbe P, et al. Targeted deep sequencing reveals clinically relevant subclonal IgHV rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017 Apr;31(4):837–45.
80. Farooqui MZH, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015 Feb;16(2):169–76.
81. Guo A, Lu P, Galanina N, Nabhan C, Smith SM, Coleman M, et al. Heightened BTK-

- dependent cell proliferation in unmutated chronic lymphocytic leukemia confers increased sensitivity to ibrutinib. *Oncotarget*. 2016 Jan 26;7(4):4598–610.
82. Burns A, Alsolami R, Becq J, Timbs A, Bruce D, Robbe P, et al. Whole-genome sequencing of chronic lymphocytic leukaemia reveals distinct differences in the mutational landscape between IgHV(mut) and IgHV(unmut) subgroups. *Leukemia*. 2017 Jun 6;
83. 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.
84. Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood*. 2015 Jul 23;126(4):454–62.
85. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Oct 10;28(29):4473–9.
86. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981 Jul 1;48(1):198–206.
87. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Jul 3;124(1):49–62.
88. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975 Aug;46(2):219–34.
89. Letestu R, Lévy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010 Nov 25;116(22):4588–90.
90. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Nov 1;29(31):4088–95.
91. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016 Jan 28;374(4):311–22.
92. O'Brien SM, Lamanna N, Kipps TJ, Flinn I, Zelenetz AD, Burger JA, et al. A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 Dec 17;126(25):2686–94.
93. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca 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.
94. Young E, Noerenberg D, Mansouri L, Ljungström V, Frick M, Sutton L-A, et al. EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017 Jul;31(7):1547–54.
95. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015 Feb;29(2):329–36.
96. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Mar 20;30(9):980–8.
97. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:481–8.

98. Cooperative Group for the Study of Immunoglobulin in Chronic Lymphocytic Leukemia, Gale RP, Chapel HM, Bunch C, Rai KR, Foon K, et al. Intravenous immunoglobulin for the prevention of infection in chronic lymphocytic leukemia. A randomized, controlled clinical trial. *N Engl J Med.* 1988 06;319(14):902–7.
99. Royle JA, Baade PD, Joske D, Girschik J, Fritschi L. Second cancer incidence and cancer mortality among chronic lymphocytic leukaemia patients: a population-based study. *Br J Cancer.* 2011 Sep 27;105(7):1076–81.
100. Maurer C, Langerbeins P, Bahlo J, Cramer P, Fink AM, Pflug N, et al. Effect of first-line treatment on second primary malignancies and Richter’s transformation in patients with CLL. *Leukemia.* 2016 Oct;30(10):2019–25.
101. Benjamini O, Jain P, Trinh L, Qiao W, Strom SS, Lerner S, et al. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia who received frontline fludarabine, cyclophosphamide and rituximab therapy: distribution and clinical outcomes. *Leuk Lymphoma.* 2015 Jun;56(6):1643–50.
102. Tambaro FP, Garcia-Manero G, O’Brien SM, Faderl SH, Ferrajoli A, Burger JA, et al. Outcomes for patients with chronic lymphocytic leukemia and acute leukemia or myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2016 Feb;30(2):325–30.
103. Bertoli S, Sterin A, Tavitian S, Oberic L, Ysebaert L, Bouabdallah R, et al. Therapy-related acute myeloid leukemia following treatment of lymphoid malignancies. *Oncotarget.* 2016 Dec 27;7(52):85937–47.
104. Richter MN. Generalized Reticular Cell Sarcoma of Lymph Nodes Associated with Lymphatic Leukemia. *Am J Pathol.* 1928 Jul;4(4):285–292.7.
105. Parikh SA, Kay NE, Shanafelt TD. How we treat Richter syndrome. *Blood.* 2014 Mar 13;123(11):1647–57.
106. Falchi L, Keating MJ, Marom EM, Truong MT, Schlette EJ, Sargent RL, et al. Correlation between FDG/PET, histology, characteristics, and survival in 332 patients with chronic lymphoid leukemia. *Blood.* 2014 May 1;123(18):2783–90.
107. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müller SP, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014 Sep 20;32(27):3048–58.
108. Michallet A-S, Sesques P, Rabe KG, Itti E, Tordot J, Tychyj-Pinel C, et al. An 18F-FDG-PET maximum standardized uptake value > 10 represents a novel valid marker for discerning Richter’s Syndrome. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(6):1474–7.
109. Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med.* 2013 Oct 21;210(11):2273–88.
110. Ding W, LaPlant BR, Call TG, Parikh SA, Leis JF, He R, et al. Pembrolizumab in patients with CLL and Richter transformation or with relapsed CLL. *Blood.* 2017 Jun 29;129(26):3419–27.
111. Kutsch N, Busch R, Bahlo J, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, et al. FCR front-line therapy and quality of life in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017 Feb;58(2):399–407.
112. Rossi D, Terzi-di-Bergamo L, De Paoli L, Cerri M, Ghilardi G, Chiarenza A, et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2015 Oct 15;126(16):1921–4.
113. Thompson PA, Tam CS, O’Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016 Jan 21;127(3):303–9.
114. Eichhorst B, Fink A-M, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line

- chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jul;17(7):928–42.
115. Eichhorst BF, Bahlo J, Maurer C, Lange E, Köppler H, Kiehl MG, et al. Favorable Toxicity Profile and Long Term Outcome of Elderly, but Physically Fit CLL Patients (pts) Receiving First Line Bendamustine and Rituximab (BR) Frontline Chemoimmunotherapy in Comparison to Fludarabine, Cyclophosphamide, and Rituximab (FCR) in Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Update Analysis of an International, Randomized Study of the German CLL Study Group (GCLLSG) (CLL10 Study). *Blood.* 2016 Dec 2;128(22):4382–4382.
116. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2014 Mar 20;370(12):1101–10.
117. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LFC, et al. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia.* 2015 Jul;29(7):1602–4.
118. Chen S-S, Chang BY, Chang S, Tong T, Ham S, Sherry B, et al. BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2016 Apr;30(4):833–43.
119. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2014 Jul 17;371(3):213–23.
120. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2015 Dec 17;373(25):2425–37.
121. Chen Q, Jain N, Ayer T, Wierda WG, Flowers CR, O'Brien SM, et al. Economic Burden of Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Oral Targeted Therapies in the United States. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2017 Jan 10;35(2):166–74.
122. Jain P, Thompson PA, Keating M, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, et al. Causes of Discontinuation and Long-Term Outcomes of Patients with CLL after Discontinuing Ibrutinib. *Blood.* 2016 Dec 2;128(22):4390–4390.
123. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, Heerema NA, Zhao W, Abruzzo L, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol.* 2015 Apr;1(1):80–7.
124. Kunk PR, Mock J, Devitt ME, Palkimas S, Sen J, Portell CA, et al. Major Bleeding with Ibrutinib: More Than Expected. *Blood.* 2016 Dec 2;128(22):3229–3229.
125. Mato AR, Lamanna N, Ujjani CS, Brander DM, Hill BT, Howlett C, et al. Toxicities and Outcomes of Ibrutinib-Treated Patients in the United States: Large Retrospective Analysis of 621 Real World Patients. *Blood.* 2016 Dec 2;128(22):3222–3222.
126. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\delta$ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014 May 29;123(22):3390–7.
127. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* 2013 Feb;19(2):202–8.
128. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016 Jun;17(6):768–78.
129. Strati P, Keating MJ, Wierda WG, Badoux XC, Calin S, Reuben JM, et al.

- Lenalidomide induces long-lasting responses in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013 Aug 1;122(5):734–7.
130. Badoux XC, Keating MJ, Wen S, Wierda WG, O'Brien SM, Faderl S, et al. Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Feb 10;31(5):584–91.
131. Fink AM, Bahlo J, Sandra R, Al-Sawaf O, Aldaoud A, Hebart H, et al. Lenalidomide Maintenance after Front Line Therapy Substantially Prolongs Progression Free Survival in High Risk CLL: Interim Results of a Phase 3 Study (CLL M1 study of the German CLL Study Group). *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):229–229.
132. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Aug 25;365(8):725–33.
133. Chanan-Khan A, Cramer P, Demirkan F, Fraser G, Silva RS, Grosicki S, et al. Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS): a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2016 Feb;17(2):200–11.
134. Hillmen P, Fraser G, Jones J, Rule S, O'Brien S, Dilhuydy MS, et al. Comparing Single-Agent Ibrutinib, Bendamustine Plus Rituximab (BR) and Ibrutinib Plus BR in Patients with Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma (CLL/SLL): An Indirect Comparison of the RESONATE and HELIOS Trials. *Blood*. 2015 Dec 3;126(23):2944–2944.
135. Zelenetz AD, Brown JR, Delgado J, Eradat H, Ghia P, Jacob A, et al. Updated Analysis of Overall Survival in Randomized Phase III Study of Idelalisib in Combination with Bendamustine and Rituximab in Patients with Relapsed/Refractory CLL. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):231–231.
136. Davids MS, Kim HT, Brander DM, Bsai J, Savell A, Francoeur K, et al. Initial Results of a Multicenter, Phase II Study of Ibrutinib Plus FCR (iFCR) As Frontline Therapy for Younger CLL Patients. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):3243–3243.
137. Seymour JF, Ma S, Brander DM, Choi MY, Barrientos J, Davids MS, et al. Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2017 Jan 12;
138. Fischer K, Al-Sawaf O, Fink A-M, Dixon M, Bahlo J, Warburton S, et al. Venetoclax and obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017 May 11;129(19):2702–5.
139. Böttcher S, Hallek M, Ritgen M, Kneba M. The role of minimal residual disease measurements in the therapy for CLL: is it ready for prime time? *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013 Apr;27(2):267–88.
140. 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 May;21(5):956–64.
141. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans P a. S, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2257–317.
142. Böttcher S, Ritgen M, Pott C, Brüggemann M, Raff T, Stilgenbauer S, et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004 Oct;18(10):1637–45.
143. Rawstron AC, Böttcher S, Letestu R, Villamor N, Fazi C, Kartsios H, et al. Improving

- efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia*. 2013 Jan;27(1):142–9.
144. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*. 2016 Apr;30(4):929–36.
145. Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Brüggemann M, Raff T, Pott C, et al. Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia*. 2009 Nov;23(11):2007–17.
146. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2010 Oct 2;376(9747):1164–74.
147. Fischer K, Cramer P, Busch R, Böttcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Sep 10;30(26):3209–16.
148. Moreton P, Kennedy B, Lucas G, Leach M, Rassam SMB, Haynes A, et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 May 1;23(13):2971–9.
149. 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.
150. Moreno C, Ritgen M, Rawstron A. Is MRD eradication a desirable goal in CLL? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Mar;23(1):97–107.
151. Milligan DW, Fernandes S, Dasgupta R, Davies FE, Matutes E, Fegan CD, et al. Results of the MRC pilot study show autografting for younger patients with chronic lymphocytic leukemia is safe and achieves a high percentage of molecular responses. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):397–404.
152. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, Davies FE, Richards SJ, Haynes AP, et al. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):29–35.
153. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, Burger J, Ferrajoli A, Jain N, et al. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3727–32.
154. Bouvet E, Borel C, Obéric L, Compaci G, Cazin B, Michallet A-S, et al. Impact of dose intensity on outcome of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen given in the first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013 Jan;98(1):65–70.
155. Ysebaert L, Gross E, Kühlein E, Blanc A, Corre J, Fournié JJ, et al. Immune recovery after fludarabine-cyclophosphamide-rituximab treatment in B-chronic lymphocytic leukemia: implication for maintenance immunotherapy. *Leukemia*. 2010 Jul;24(7):1310–6.
156. Bosch F, Ferrer A, Villamor N, González M, Briones J, González-Barca E, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Jan 1;14(1):155–61.

157. Ritgen M, Lange A, Stilgenbauer S, Dohner H, Bertscher C, Bosse H, et al. Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):2049–53.
158. Dhédin N, Huynh A, Maury S, Tabrizi R, Beldjord K, Asnafi V, et al. Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015 Apr 16;125(16):2486–2496; quiz 2586.
159. Thompson PA, Strati P, Keating M, O'Brien SM, Ferrajoli A, Burger JA, et al. Early Achievement of MRD-Negativity in IGHV-Mutated (IGHV-M) 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 Dec 2;128(22):232–232.
160. Dreger P, Döhner H, Ritgen M, Böttcher S, Busch R, Dietrich S, et al. Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood*. 2010 Oct 7;116(14):2438–47.
161. Krämer I, Stilgenbauer S, Dietrich S, Böttcher S, Zeis M, Stadler M, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk CLL: 10-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood*. 2017 Jul 17;
162. Tournilhac O, Garff-Tavernier ML, Tabrizi R, Quoc SN, Legrand-Izadifar F, Chevallier P, et al. RIC Allogeneic Stem Cell Transplantation for High Risk CLL Followed By Preemptive MRD-Based Immunointervention - Intermediate Results from the Phase II ICLL03 Ricac-Pmm Trial (FILO & SFGM-TC French intergroup). *Blood*. 2015 Dec 3;126(23):3222–3222.
163. Thompson PA, Stingo F, Keating MJ, Wierda WG, O'Brien SM, Estrov Z, et al. Long-term follow-up of patients receiving allogeneic stem cell transplant for chronic lymphocytic leukaemia: mixed T-cell chimerism is associated with high relapse risk and inferior survival. *Br J Haematol*. 2017 May;177(4):567–77.
164. Lepretre S, Aurran T, Mahé B, Cazin B, Tournilhac O, Maisonneuve H, et al. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2012 May 31;119(22):5104–10.
165. Shanafelt TD, Ramsay AG, Zent CS, Leis JF, Tun HW, Call TG, et al. Long-term repair of T-cell synapse activity in a phase II trial of chemoimmunotherapy followed by lenalidomide consolidation in previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2013 May 16;121(20):4137–41.
166. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*. 2012 Aug 16;120(7):1412–21.
167. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2014 Feb;24:71–81.
168. Jones JA, Byrd JC. How will B-cell-receptor-targeted therapies change future CLL therapy? *Blood*. 2014 Mar 6;123(10):1455–60.
169. Idler I, Giannopoulos K, Zenz T, Bhattacharya N, Nothing M, Döhner H, et al. Lenalidomide treatment of chronic lymphocytic leukaemia patients reduces regulatory T cells and induces Th17 T helper cells. *Br J Haematol*. 2010 Mar;148(6):948–50.
170. Kater AP, Tonino SH, Egle A, Ramsay AG. How does lenalidomide target the chronic

- lymphocytic leukemia microenvironment? *Blood*. 2014 Oct 2;124(14):2184–9.
171. Gottlieb D, Aurran T, Tam CS, Sartor M, Letestu R, Carney D, et al. Interim Analysis of Lenalidomide Consolidation on Minimal Residual Disease in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Following Initial FCR Chemotherapy - CLL6 Residuum Study of the Australian Leukaemia and Lymphoma Group (ALLG) and the French Innovative Leukemia Organization (FILO). *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):2053–2053.
172. Foà R, Schuh A, Zaritskey A, Semochkin S, Simpson D, Egyed M, et al. Results of the Phase 3 Study of Lenalidomide Versus Placebo As Maintenance Therapy Following Second-Line Treatment for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (the CONTINUUM Trial). *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):230–230.
173. Andersen NS, Pedersen LB, Laurell A, Elonen E, Kolstad A, Boesen AM, et al. Pre-emptive treatment with rituximab of molecular relapse after autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4365–70.
174. Ferrero S, Monitillo L, Mantoan B, Barbero D, Genuardi E, Barbiero S, et al. Rituximab-based pre-emptive treatment of molecular relapse in follicular and mantle cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2013 Nov;92(11):1503–11.
175. Kolstad A, Pedersen LB, Eskelund CW, Husby S, Grønbaek K, Jerkeman M, et al. Molecular Monitoring after Autologous Stem Cell Transplantation and Preemptive Rituximab Treatment of Molecular Relapse; Results from the Nordic Mantle Cell Lymphoma Studies (MCL2 and MCL3) with Median Follow-Up of 8.5 Years. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2017 Mar;23(3):428–35.
176. Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, Bahlo J, Cramer P, von Tresckow J, et al. Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 Aug 29;
177. 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.
178. Rawstron AC, Howard D, McParland L, Tute RM de, Collett L, Phillips D, et al. Compartment Effect on the Prognostic Significance of MRD Detection in CLL: Impact of Treatment Type and Duration of Follow-up. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):3226–3226.

---

**SUIVI DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE APRÈS  
IMMUNOCHIMIOTHERAPIE PAR RITUXIMAB, FLUDARABINE ET  
CYCLOPHOSPHAMIDE EN PREMIERE LIGNE DE LEUCEMIE LYMPHOÏDE  
CHRONIQUE : IMPLICATIONS POUR LA PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE**

---

**RESUME EN FRANÇAIS :**

Après Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide (RFC) dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), le niveau de maladie résiduelle minime (MRD) est associé à la survie sans progression (PFS) et à la survie globale (OS), mais les rechutes sont constantes et les cellules de LLC sont très dépendantes de leur micro-environnement notamment ganglionnaire.

Nous avons étudié l'influence de la reconstitution immunitaire sur la PFS et l'OS chez 162 patients recevant du RFC pour une LLC dans le Sud-Ouest de la France entre 2005 et 2016.

Les patients avaient un âge médian de 61,5 ans avant traitement, étaient majoritairement *IGHV* non muté (63,4%) et avaient reçu 6 cures de RFC pour plus de 75% d'entre eux. A la fin de traitement (EOT) le niveau de MRD était bas, intermédiaire et élevé chez respectivement 65,3%, 27,2% et 7,5% des patients. En analyse multivariée, la MRD ( $p=0,006$ ) à EOT et sa croissance ( $p<0,001$ ) étaient associées à la PFS, tout comme la valeur élevée de lymphocytes T CD4+ ( $p=0,001$ ). Chez les patients ayant une MRD intermédiaire à EOT, ceux ayant des  $CD4 \leq 200/mm^3$  avaient une PFS de 53% à 5 ans, contre 7,7% si  $CD4 > 200/mm^3$  ( $p=0,0001$ ). Les patients *IGHV* non mutés avaient une PFS médiane de 63,7 mois si  $CD4 EOT \leq 200/mm^3$ , contre 30,7 mois si  $CD4 EOT > 200/mm^3$  ( $p<0,0001$ ).

L'analyse univariée des facteurs associés à la survie globale retrouve l'importance d'éradiquer la MRD ( $p<0,001$ ), mais également l'apport prédictif de la mesure du taux de lymphocytes T CD4 en fin de traitement ( $p=0,001$ ). Chez les patients *IGHV* non mutés, les CD4 à EOT sont un marqueur pronostique de qualité et pourraient servir à guider les indications de maintenance.

---

**TITRE EN ANGLAIS :** Immune reconstitution following fludarabine, cyclophosphamide and rituximab in treatment-naive chronic lymphocytic leukemia patients: implications for therapy.

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** Médecine spécialisée clinique

---

**MOTS-CLÉS :** leucémie lymphoïde chronique, maladie résiduelle minime, reconstitution immunitaire, lymphocytes T CD4, maintenance.

---

**INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Université Toulouse III-Paul Sabatier  
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,  
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

---

Directeur de thèse : Loïc YSEBAERT