Détermination de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans la leucémie lymphoïde chronique : état des lieux des pratiques techniques et perspectives

Rémi Letestu, service d'hématologie biologique, HUPSSD, hôpital Avicenne, AP-HP et UFR SMBH, université Paris13, Bobigny
Magali Le Garff-Tavernier, service d'hématologie biologique, hôpitaux universitaires Pitié Salpêtrière – Charles Foix, AP-HP, et Inserm UMRS 1138, centre de recherche des Cordeliers, Paris

Tirés à part : R. Letestu
remi.letestu@aphp.fr

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Determination of residual disease by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: state of play of technical practices and prospects

Maladie résiduelle, leucémie lymphoïde chronique, cytométrie en flux
Minimal residual disease, chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry

Résumé

Le suivi de la maladie résiduelle (MRD) dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est, selon les recommandations de bonne pratique, réalisé dans le cadre d'essais cliniques. La cytométrie en flux (CMF) est la technique de prédilection pour cette analyse spécialisée, mais son utilisation en pratique de routine est peu documentée. Au début de l'année 2019, une enquête a été menée auprès des laboratoires de biologie disposant d'un secteur de cytométrie en flux, concernant l'activité de MRD dans la LLC. Quatre-vingts réponses ont été recueillies, leur analyse nous a permis de dresser le panorama des pratiques, au niveau national, de la MRD dans la LLC. Cette étude montre que ce test est principalement réalisé par les laboratoires d'hématologie, dans un contexte de centre hospitalier publique, et qu'il n'est disponible que dans un nombre restreint de centres. Cependant, de nombreux centres ont formulé le souhait de se former à cette technique et de participer à un groupe de travail dédié à cette thématique.

Abstract

Minimum Residual Disease (MRD) assessment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is restricted to clinical trials according to good practice recommendations. Flow cytometry (FCM) is the preferred method for this specialized activity but little is known as regard to its use in routine laboratory practice. Early 2019, a survey was conducted in laboratories with flow cytometry departments, concerning the practice of MRD tests in CLL. Eighty responses were collected, allowing us to define the landscape of CLL MRD assessment in France. This study shows that MRD tests are mainly performed by hematology laboratories in public hospitals, but in a reduced number of centers. However, numerous laboratories wanted to receive training and join a working group on the subject. This work highlights the need for an evolution of the practices to make MRD test more broadly available, anticipating a possible evolution of the indications of this test in the follow-up of treated CLL patients.

Pour citer cet article : Letestu R, Le Garff-Tavernier M. Détermination de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans la leucémie lymphoïde chronique : état des lieux des pratiques techniques et perspectives. *Hématologie* 2019 ; vol. supplément 2, juin : 24-36. doi : 10.1684/hma.2019.1466

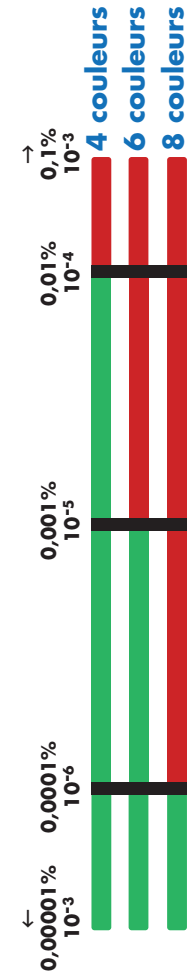
doi: 10.1684/hma.2019.1466

Ce travail souligne le besoin d'une évolution des pratiques et de l'organisation de l'offre de cette analyse afin d'anticiper un possible, sinon probable, élargissement de ses indications dans la prise en charge des patients traité pour une LLC.

L'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) correspond à la mesure de la charge tumorale résiduelle, dans le sang ou la moelle, après traitement. Elle met ainsi en évidence la persistance ou la réapparition de cellules pathologiques. Dans ce contexte d'événements rares, il est nécessaire d'utiliser des méthodes de détection très sensibles. Le seuil de « positivité » clinique, défini dans les recommandations internationales pour la leucémie lymphoïde chronique (LLC), [1] a été établi sur la base des performances des techniques de cytométrie en flux (CMF) disponibles à l'époque. Ce seuil correspond à la détection d'une cellule de LLC pour 10 000 leucocytes, soit 0,01 %. Il est depuis utilisé dans les protocoles de recherche clinique et est demeuré inchangé dans les recommandations les plus récentes [2], bien que les performances technologiques nous permettent d'atteindre une profondeur de détection bien plus importante.
L'évaluation optimale de la MRD dans la LLC est une problématique qui s'est imposée, il y a maintenant plus de dix ans, tout d'abord au sein de l'intergroupe coopératif français LLC/macroglobulinémie de Waldenstrom (GCF-LLC/MW), puis au sein de la French Innovative Leukemia Organization LLC (FILO-LLC). Les approches techniques utilisées au sein de ces protocoles de recherche clinique ont précédé les recommandations techniques internationales, en suivant les évolutions technologiques de la CMF (nouvelles générations de cytomètres permettant d'accéder à de la multifluorescence). Cette anticipation a permis de faire évoluer simultanément les indications et les objectifs de la MRD avec l'amélioration de la profondeur de détection de la MRD. Comme indiqué dans la *figure 1*, la MRD a initialement été l'objet d'études ancillaires, puis est devenue un objectif secondaire et enfin un objectif principal comme paramètre de substitution à la survie sans progression (SSP). Dès 2013, avec le protocole RICAC-PMM dans l'allogreffe, et depuis fin 2015 avec le protocole ICLL07-GAI chez les sujets jeunes, l'utilisation protocolaire de la MRD a franchi un cap en devenant un critère décisionnel pour l'adaptation thérapeutique. Cette progression dans l'importance clinique de la MRD a été permise par l'évolution parallèle des performances de la technique. Les approches « quatre couleurs » de moyenne résolution ont progressivement été remplacées par les techniques sensibles en « six couleurs » et plus récemment les techniques de haute sensibilité en « huit à dix couleurs » (*figure 2*), avec des performances remarquables, puisque atteignant des limites de détection de 10^{-6} en oligocentrique. Dans la LLC, le choix a été fait d'évaluer la MRD par CMF. En effet, la cellule de LLC est phénotypiquement très homogène et très caractéristique, la rendant facilement reconnaissable et distinguable des lymphocytes B normaux et des autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B. Par ailleurs, ses caractéristiques phénotypiques sont stables après un traitement standard, ce qui permet de pouvoir potentiellement évaluer la MRD par CMF chez tous les patients, même en l'absence de phénotypage réalisé en préthérapeutique. La CMF, enfin, est une technique peu coûteuse et à rendu de résultats rapide. Elle présente l'avantage d'être facilement accessible, étant présente dans de nombreux centres hospitaliers français. Les approches par biologie moléculaire ont également été évaluées dans la LLC, mais leur applicabilité est moins importante pour les techniques de PCR spécifique d'allèle [3, 5] et reste à définir pour le séquençage de nouvelle génération (NGS). La comparaison entre le NGS et une approche par CMF six couleurs, adaptable en huit couleurs, a été réalisée dans une étude britannique [6]. Celle-là montre une bonne corrélation des deux techniques en dessous du seuil de 0,01 % et jusqu'entre 0,001 % et 0,0001 %. Elle n'a en revanche pas évalué ces

FIGURE 1

Protocoles nationaux	Indication/objectif de la MRD dans le protocole	Marqueurs	Performances de la technique
4 couleurs - Techniques moyenne résolution			
FC oral sujets jeunes en 1° ligne [16] **Auto-greffe vs chimiothérapie** sujets jeunes en 1° ligne [17]	**Etude ancillaire**	**5 tubes** [18] ERIC CD45-CD14-CD19-CD3 Kappa-Lambda-CD19-CD5 CD81-CD22-CD19-CD5 CD43-CD79b-CD19-CD5 CD20-CD38-CD19-CD5 **1 tube** [19] GOELLC/MW CD20-CD79b-CD19-CD5	**Limite de détection 10^{-4}** **MRD⁺ ≥ 0,01%**
6 couleurs-Techniques sensibles			
FMP2007 [12] **CLL2007 SA** [13]	**Objectif secondaire**	**2 tubes** [14] ERIC CD3-CD38-CD5-CD19-CD79b-CD20 CD81-CD22-CD5-CD19-CD43-CD20 **4 tubes** [7] FILO CD45-CD14-CD5-CD19-CD45-CD3 Kappa-Lambda-CD5-CD19-CD81-CD3+14 CD43-CD22-CD5-CD19-CD81-CD3+14 CD43-CD79b-CD5-CD19-CD81-CD3+14	**Limite de détection 10^{-5}** **MRD⁺ ≥ 0,001%**
8 et 10 couleurs-Techniques très haute sensibilité			
FMP2010 [8] **ICLL07 GAI** [9] **ICLL01 BOMP** [10] **RICAC-PMM** [11]	**FMP2010** : Critère de réponse comme objectif principal – paramètre de substitution à la PFS **ICLL01BOMP** : Objectif secondaire **ICLL07 GAI/ RICAC PMM** : Critère décisionnel pour les indications thérapeutiques	**1 tube** [6] ERIC CD19-CD20-CD5-CD43-CD79b-CD81 + 2 marqueurs FILO **1 tube** [3, 4] 8 couleurs 9 marqueurs CD20-CD45-CD81-CD22+CD79b-CD5-CD19-CD200-CD43 **1 tube** [11] 10 couleurs 11 marqueurs Kappa-Lambda-CD3+CD14-CD19-CD5 CD81-CD22-CD43-CD20-CD45	**Limite de détection 10^{-6}** **MRD⁺ ≥ 0,0001%** FILO



Évolution des panels d'étude de la maladie résiduelle LLC par CMF depuis 2005 [7-14, 16-19].

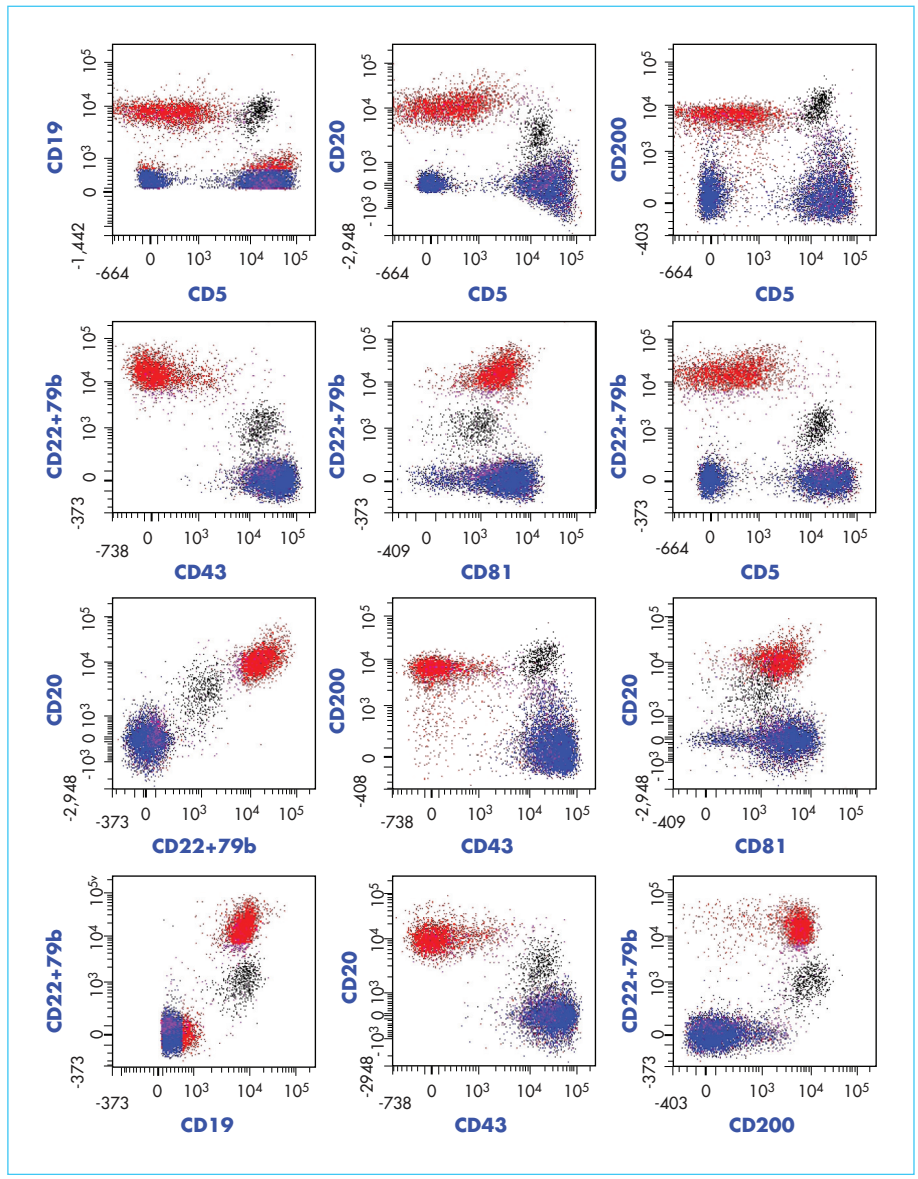
méthodes, ni leur applicabilité, de manière prospective, sur un nombre élevé de patients. La CMF est donc actuellement la technique de prédilection pour l'évaluation de la MRD dans la LLC.

Rationnel de l'enquête nationale sur la maladie résiduelle dans la leucémie lymphoïde chronique

Dans le cadre des groupes de travail sur la MRD-LLC de l'AFC (Association française de cytométrie) et du FILO-LLC, une enquête a été lancée afin de réaliser un état des lieux des pratiques sur l'analyse de la MRD chez les patients traités pour une LLC. L'objectif était de prendre un instantané sur le sujet et de recueillir les souhaits des participants désireux de faire évoluer leurs pratiques. Elle s'adressait à tous les laboratoires disposant d'un secteur de cytométrie en flux, qu'ils réalisent ou non cette analyse.

L'ambition de cette étude était d'obtenir une vision globale des pratiques, à l'échelon national, en vue de réaliser une cartographie de la disponibilité de l'évaluation de la MRD LLC.

FIGURE 2



Exemple d'une MRD LLC positive estimée à 0,1% et évaluée par CMF avec le panel 8 couleurs 9 marqueurs (FMP2010 [3], ICLL07-GAI [4]).

L'enquête s'est déroulée du 28 février au 20 mars 2019. Les participants étaient invités à remplir un questionnaire accessible, sur une plateforme en libre accès, par un lien Internet. Elle était composée d'une première partie générale (*figure 3A*), accessible à tous, composée de six questions destinées à préciser le profil des participants. Le questionnaire était ensuite subdivisé en deux volets, selon que le laboratoire réalisait ou non l'analyse de la MRD dans la LLC. Suivait alors une série de douze ou de cinq questions, respectivement, afin de préciser les conditions de réalisation et les procédures utilisées, ou de préciser les motifs pour lesquels l'analyse n'était pas réalisée localement. Enfin, il s'agissait de déterminer dans chaque groupe les besoins en termes d'évolution et de perspectives.

FIGURE 3

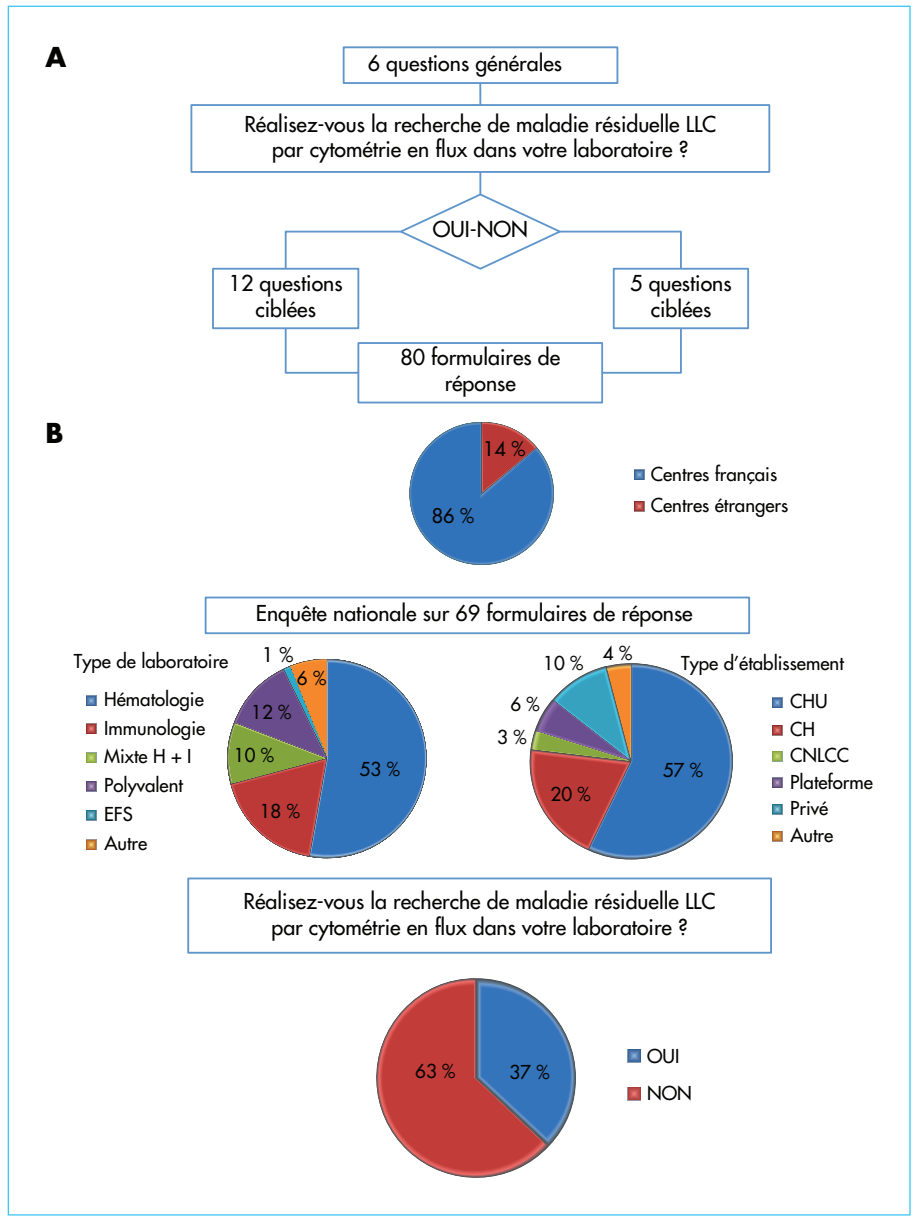


Schéma de l'étude et résultats globaux.

Résultats

Panorama des laboratoires participants

Le format de l'étude a permis de toucher un nombre important de laboratoires ; le panorama des laboratoires est présenté dans la *figure 3B*.

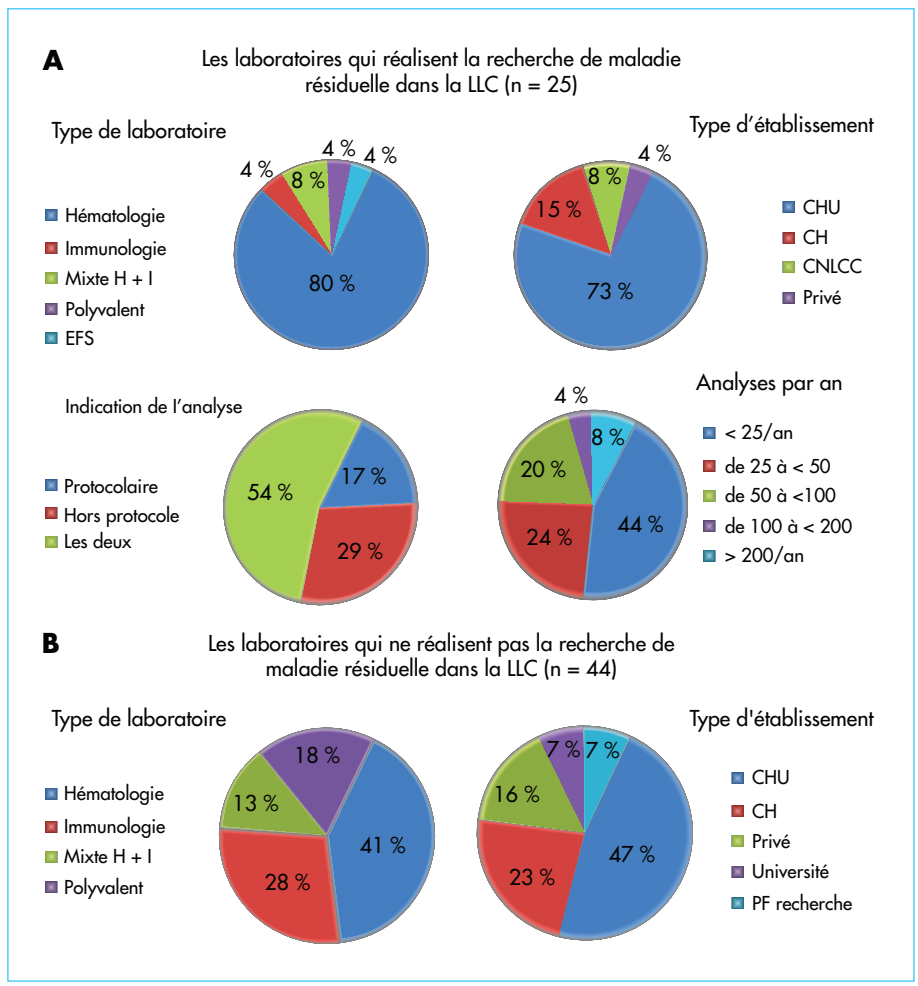
Sur les quatre-vingt formulaires recueillis, onze (14 %) provenaient de laboratoires étrangers francophones et sortaient du cadre initial de l'étude (état des lieux national des pratiques). Ce groupe a donc fait l'objet d'une analyse séparée.

Sur le plan national, les soixante-neuf centres ayant répondu à l'enquête correspondent à 80 % à des structures hospitalières (centres hospitalo-universitaires [CHU], centres hospitaliers et centres nationaux de lutte contre le cancer) avec une majorité de CHU (57 %). Néanmoins, 20 % des participants exercent dans une structure privée (10 %) ou sur une plateforme de recherche de cytométrie (6 %).
Dans la majorité des cas, il s'agit de laboratoires d'hématologie, mais le questionnaire a également suscité l'intérêt d'une proportion inattendue de laboratoires d'immunologie (18 %), dont les besoins semblent différer et qui feront l'objet d'une analyse spécifique. Les laboratoires déclarant une activité mixte (hématologie et immunologie) ont un profil de réponse qui se rapproche de celui des laboratoires d'hématologie.
Enfin, près des deux tiers des laboratoires déclarent ne pas réaliser ce test.

Qui fait quoi et dans quel cadre ?

L'analyse de la MRD est réalisée essentiellement au sein d'établissements hospitaliers publics et très peu dans les établissements de santé privés (*figure 4A*). Comme attendu, les laboratoires d'hématologie et à activité mixte (hématologie et

FIGURE 4



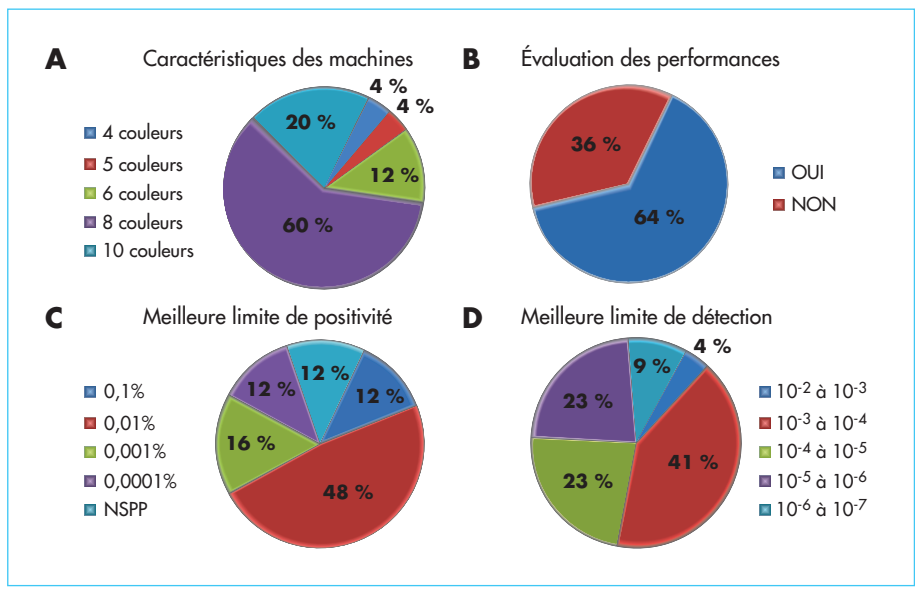
Profil des laboratoires en fonction de l'activité MRD LLC.

immunologie) assurent très majoritairement cette activité (88 % des participants). Très peu de laboratoires d'immunologie offrent actuellement ce test.
L'indication pour laquelle le test est demandé est intéressante. Une proportion importante de laboratoires (54 %) rapportent qu'ils l'effectuent aussi bien dans le cadre de protocoles que pour des demandes non protocolaires.
Enfin, concernant le nombre de tests effectués par an, plus des deux tiers des centres ont un faible recrutement (moins de cinquante par an) tandis qu'une minorité (12 %), correspondant aux centres les plus actifs dans les essais cliniques du FILO, en font plus de 100 par an.
La répartition des types de laboratoires qui ne réalisent pas la recherche de MRD pour la LLC (*figure 4B*) est différente. Si de nombreux centres hospitaliers n'ont pas développé cette activité, comme attendu, elle n'est également pas réalisée sur les plateformes de recherche ni dans les laboratoires privés. La proportion de laboratoires polyvalents et des laboratoires à activité mixte est plus importante dans ce groupe et on y retrouve la grande majorité des laboratoires d'immunologie.

Aperçu des techniques utilisées

Dans la grande majorité des cas, les centres sont équipés de cytomètres en flux en huit (60 %) et dix couleurs (20 %) (*figure 5A*). Ces machines permettent d'accueillir les techniques les plus sensibles développées récemment. Moins de 10 % des centres ne peuvent appliquer que les méthodes les plus anciennes.
Plus des deux tiers des laboratoires ont testé les performances de leur technique (*figure 5B*). Classiquement, deux indicateurs permettent d'évaluer les performances des tests rendus. Le premier est le taux le plus bas auquel on est en mesure d'affirmer une MRD positive (*figure 5C*). Moins de un tiers (28 %) des centres déclarent pouvoir détecter la présence de cellules de LLC en dessous de 0,01 %, et près de la moitié atteignent le seuil minimal de 0,01 %. Inversement, lorsque les cellules de LLC ne sont pas détectables, la profondeur (donc la qualité) du résultat est indiquée par la limite de détection du test (*figure 5D*). Seuls 55 % des laboratoires atteignent régulièrement une limite de détection compatible avec le

FIGURE 5



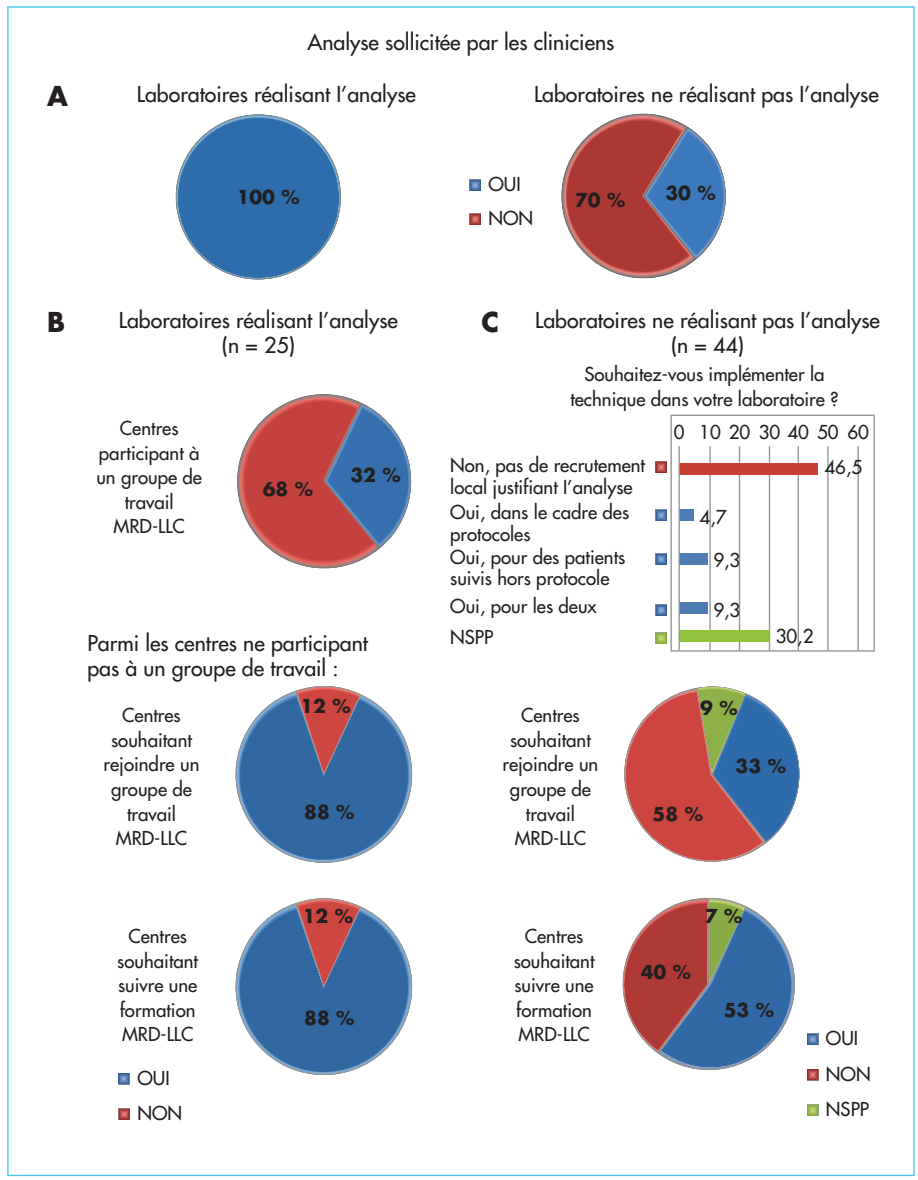
Les techniques utilisées dans les laboratoires (n = 25).

seuil clinique de 0,01 % dont 23 % $< 10^{-5}$ et 9 % rendent des résultats ultrasensibles à 10^{-6}.

Bilan et perspectives

De manière attendue, tous les laboratoires qui réalisent cette analyse sont sollicités par les cliniciens de leur centre pour sa réalisation, et pas exclusivement dans le cadre des recommandations publiées. De plus, un peu moins de un tiers des centres (30 %) qui ne réalisent pas l'évaluation de la MRD sont également l'objet de sollicitations de la part de services cliniques (*figure 6A*). Sont essentiellement concernés par cette demande les laboratoires d'hématologie (dix centres sur seize = 63 %), alors que les laboratoires d'immunologie qui ne proposent pas ce

FIGURE 6



Perspectives.

test, ne sont pas sollicités. Pourtant, près de la moitié de ces derniers seraient paradoxalement demandeurs d'une formation technique et/ou pratique, sans toutefois souhaiter intégrer un groupe de travail dans l'immédiat.
Parmi les laboratoires réalisant l'analyse, la très grande majorité (88 %) souhaitent intégrer un groupe et suivre une formation MRD-LLC (*figure 6B*). Les laboratoires souhaiteraient faire évoluer la technique qu'ils utilisent, soit parce qu'ils n'en sont pas satisfaits (sensibilité insuffisante), soit en raison d'un changement de plateforme technique, soit enfin parce qu'ils souhaitent faire évoluer leur activité. Les centres ne formulent pas le besoin d'évolution par rapport à cette analyse quand elle est réalisée hors protocole.
Un tiers des laboratoires ne réalisant pas l'étude de la MRD souhaiteraient la développer (*figure 6C*). Ces centres souhaitent bénéficier d'une technique validée par un groupe de travail, neuf sur dix sont désireux de suivre une formation, mais seulement quatre sur dix d'intégrer un groupe de travail.

Focus sur les laboratoires étrangers francophones

Enfin, onze participants sont des laboratoires francophones situés en Belgique (cinq), en Suisse (trois), au Luxembourg (deux) et au Maroc (un). Écartés de l'analyse pour l'enquête nationale, leur profil nous permet d'observer qu'il s'agit essentiellement de laboratoires d'hématologie de CHU (sept centres sur onze). Seuls trois d'entre eux réalisent ce test mais neuf seraient demandeurs de formation et six souhaiteraient intégrer un groupe de travail, malgré une faible demande de la part de leurs cliniciens.

Discussion

La pratique de l'analyse de MRD est un sujet en pleine évolution grâce aux performances des techniques de CMF développées ces dernières années et aux nouvelles approches thérapeutiques. Actuellement, ses indications en tant qu'analyse biologique restent limitées aux essais cliniques dans les recommandations récemment révisées. Cependant, le développement des thérapies ciblées ou de schémas thérapeutiques complexes laisse supposer un élargissement à venir de ces indications, au moins pour l'évaluation de la qualité de la réponse si ce n'est pour le choix des options thérapeutiques ou comme critère d'arrêt du traitement.
Dans ce contexte, et sur la base de l'expertise acquise au cours de plus de dix ans de travaux de mise au point et d'évaluation de la MRD par CMF dans les protocoles du FILO-LLC, le groupe de travail MRD-LLC a été créé au sein de l'AFC. Le but de ce groupe est de constituer un espace d'échange et de partage de cette expérience, afin de faciliter l'accès à cette technique et de faire bénéficier les centres biologiques qui souhaitent réaliser cette analyse des outils validés les plus récents.
Une étape importante pour l'activité future du groupe MRD-LLC consistait à évaluer la situation à l'échelon national et à estimer les souhaits et les besoins en termes de formation concernant ce test spécialisé. Concrétisée sous la forme d'une enquête diffusée largement dans la communauté de la cytométrie, avec une participation dépassant ce qui était attendu, elle montre que cette question est un sujet d'intérêt pour les laboratoires français. Comptabiliser soixante-neuf formulaires de réponse suggère que la plupart des laboratoires des trente CHU et des principaux centres hospitaliers généraux (CHG) sont représentés. En effet, les échanges interlaboratoires mis en place pour l'évaluation externe de qualité du diagnostic de l'HPN [15] permettent d'approcher le nombre de centres réalisant des analyses spécialisées en CMF. Or, depuis 2013, ce programme compte un nombre stable de centres français : une cinquantaine. Sans pouvoir exclure un biais d'échantillonnage, comme pour tout questionnaire de ce type, la représentativité dans cette étude semble tout à fait acceptable.

La répartition des centres réalisant la recherche de MRD dans la LLC est telle qu'attendue. Cette analyse est plus facilement disponible dans les CHU et les grands CHG, en raison de son caractère spécialisé, et est prise en charge dans les laboratoires d'hématologie, qui ont naturellement développé ce test et sont plus sollicités pour sa réalisation.

La MRD LLC ne faisant pas partie intégrante des analyses de suivi dans les recommandations officielles de prise en charge des patients traités pour une LLC, il est inattendu d'observer que plus de un tiers des centres déclarent la réaliser. En effet, aussi bien les recommandations internationales de l'International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) 2018 que le guide de juste prescription rédigé par le Réseau de biologie innovatrice en oncohématologie (RuBIH) réactualisé courant 2018 et présenté au congrès 2019 de la Société française d'hématologie, indiquent que l'évaluation de la MRD LLC reste limitée aux protocoles de recherche clinique.

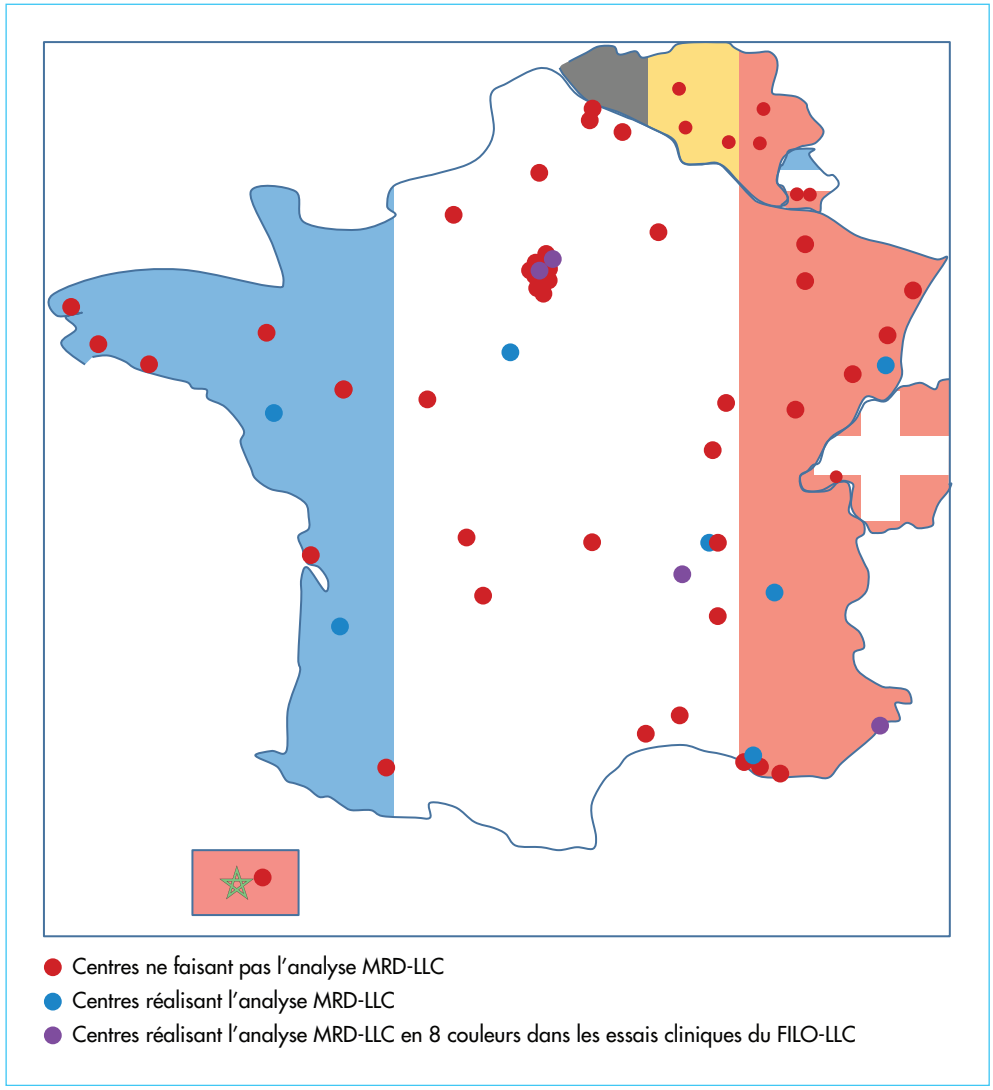
Malgré un pourcentage relativement important de laboratoires réalisant ce test, cette activité reste centralisée, avec un nombre restreint de centres experts réalisant plus de 100 analyses par an, suivi d'un plus grand nombre de centres ayant, eux, une faible activité (*figure 7*). D'un point de vue économique, le nombre d'analyses par an n'apparaît pas en soi comme un facteur limitant, puisque tous ces centres possèdent par ailleurs une activité de CMF. En revanche, la question du maintien de l'expérience et du savoir-faire se pose pour les centres réalisant un très faible nombre annuel d'analyses.

Au cours des dix dernières années, les évolutions technologiques dans le domaine de la CMF ont permis d'accéder, dans les laboratoires spécialisés, à des machines de plus en plus évoluées offrant la possibilité de mettre en œuvre une CMF réellement multiparamétrique. Ainsi, si les tests de MRD validés et publiés dans la littérature ont initialement fait appel à des techniques en quatre couleurs, puis à six et à huit couleurs, nous observons que la quasi-totalité du parc de cytométrie français est adapté (cytomètres à au moins huit couleurs) pour mettre en œuvre les techniques de MRD les plus abouties. Ils peuvent donc accueillir les techniques les plus sensibles développées et validées dans le groupe de travail MRD-LLC du FILO.

Les résultats de cette enquête montrent que les points critiques essentiels sont relatifs à l'échange des connaissances et à la formation aux techniques sensibles. En effet, presque la moitié des centres n'atteignent pas la limite de sensibilité requise de 0,01 % nécessaire pour un rendu de résultat conforme aux recommandations internationales en cours [1, 2]. De plus, l'évaluation de la technique mise en place localement afin de vérifier qu'elle atteint les performances théoriques annoncées ne semble pas systématique. Ces constatations suggèrent que certains centres biologiques bénéficieraient du soutien des centres experts. Ces travaux peuvent trouver leur place au sein du groupe de travail MRD-LLC, d'autant plus que de nombreux centres français et étrangers ont exprimé leur motivation et leur souhait de participer à un groupe de travail. Enfin, dans un second temps, ce groupe permettra le partage d'expérience pour l'analyse des données et l'interprétation des résultats, et à plus long terme la promotion de la mise en place d'un suivi qualité.

Actuellement, l'organisation du réseau MRD dans les essais cliniques est oligocentrique, avec peu de centres assurant une importante activité. Dans cette configuration, les capacités de prise en charge ne permettraient pas d'absorber une demande beaucoup plus forte. Dans le même temps, les laboratoires sont sollicités par leurs cliniciens pour réaliser cette analyse. Le besoin semble donc identifié, et soulève la question de l'organisation future : faut-il se préparer à une probable évolution des indications de l'analyse de la MRD LLC en dehors des protocoles, à moyen terme ? Dans l'affirmative, il serait nécessaire d'anticiper l'adaptation du réseau de laboratoires réalisant ce test.

FIGURE 7



Répartition des centres sur le territoire national.

Pour cela, différentes options peuvent être envisagées. Favoriser la persistance d'un groupe oligocentrique implique l'organisation d'un circuit des échantillons lourd et coûteux avec un risque d'altération de la qualité du prélèvement. Un développement plus multicentrique, sur la base du volontariat et en adéquation avec le recrutement clinique local, diminuerait ces inconvénients. Ce type de réseau supposerait une formation des centres et le suivi d'indicateurs de maintien de la compétence. Ces options seraient à évaluer d'un point de vue médico-économique également.

Conclusion

L'évolution des stratégies et des outils thérapeutiques dans la LLC fait entrevoir une probable modification de l'offre et de la demande en termes de suivi de la MRD dans un avenir proche. Cette analyse spécialisée nécessite un savoir-faire technicobiologique dont la maîtrise suppose une formation spécifique et surtout

l'acquisition d'une expérience durable. Des outils élaborés par le groupe MRD du FILO-LLC dans ses essais cliniques sont disponibles et de nombreux centres biologiques ont exprimé leur motivation à les mettre en œuvre. Enfin, le groupe de travail MRD-LLC de l'AFC propose non seulement un cadre afin de partager cette expérience et d'assurer la formation des centres demandeurs, mais également d'aller plus loin dans la compréhension de l'analyse des données et de l'évaluation qualité. Les conditions semblent donc réunies pour permettre une évolution des pratiques dans l'étude de la MRD, avec pour objectif de s'adapter au mieux aux futurs besoins dans la prise en charge des patients traités pour une LLC.

Références

[1] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, *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 ; 111 (12) : 5446-56. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906 Erratum in: *Blood* 2008 ; 112(13) : 5259.

[2] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of CLL. *Blood* 2018 ; 131 (25) : 2745-60. doi: 10.1182/blood-2017-09-806398.

[3] Letestu R, Cartron G, Lepretre S, *et al.* Minimal residual disease (MRD) by 8-color flow cytometry (Flow-MRD) and IGH clonospecific quantitative PCR (ASO RQPCR) reached similar performances for evaluation of CLL treatment in a phase II clinical trial: cross validation of the methods. *Blood* 2014 ; 124 (21) : 3307.

[4] Michallet A-S, Dilhuydy M-S, Subtil F, *et al.* High rate of complete response (CR) with undetectable bone marrow minimal residual disease (MRD) after chemo-sparing and MRD-driven strategy for untreated fit CLL patients: final results of the Icll 07 FILO trial. *Blood* 2018 ; 132 : 1858.

[5] Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch R, *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 ; 23 (11) : 2007-17. doi: 10.1038/leu.2009.140.

[6] Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, *et al.* A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European research initiative on CLL study. *Leukemia* 2016 ; 30 (4) : 929-36.

[7] Lepretre S, Aurran T, Mahé B, *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 ; 119 (22) : 5104-10.

[8] Cartron G, Letestu R, Dartigeas C, *et al.* Increased rituximab exposure does not improve response and outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia after fludarabine, cyclophosphamide, rituximab. A french innovative leukemia organization (FILO) study. *Haematologica* 2018 ; 103 (8) : e356-9. doi: 10.3324/haematol.2017.182352.

[9] Michallet A-S, Dilhuydy M-S, Subtil F, *et al.* Phase II, multicenter trial, exploring "chemo-sparing" strategy associating obinutuzumab+ibrutinib followed by a MRD driven strategy, in previously untreated symptomatic medically fit chronic lymphocytic leukemia patients (CLL): preliminary results of the induction phase of the Icll-07 FILO study. *Blood* 2017 ; 130 : 497.

[10] de Guibert S, Dilhuydy M-S, Ysebaert L, *et al.* Bendamustine, ofatumumab and high-dose methylprednisolone (BOMP) in relapsed/refractory CLL: results of a planned interim analysis of the french CLL intergroup ICLL01 phase II trial. *Blood* 2014 ; 124 : 3341.

[11] Tournilhac O, Le Garff-Tavernier M, Tabrizi R, *et al.* RIC allogeneic stem cell transplantation for high risk CLL followed by preemptive MRD-based immunointervention – final results from the phase II ICLL03 Ricac-Pmm trial (FILO – SFGM-TC french intergroup). *Blood* 2017 ; 130 : 4599.

[12] Feugier P, Aurran T, Mahé B, *et al.* Long-term follow up of the CLL2007FMP trial evaluating fludarabine and cyclophosphamide in combination with either rituximab or alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2018 ; 103 (7) : e304-6. doi: 10.3324/haematol.2017.183350.

[13] Dartigeas C, Van Den Neste E, Léger J, *et al.* Rituximab maintenance *versus* observation following abbreviated induction with chemoimmunotherapy in elderly patients with previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (CLL 2007 SA): an open-label, randomised phase 3 study. *Lancet Haematol* 2018 ; 5 (2) : e82-94. doi: 10.1016/S2352-3026(17)30235-1.

[14] Rawstron AC, Böttcher S, Letestu R, *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 ; 27 (1) : 142-9.

[15] Debliquis A, Wagner-Ballon O, Le Garff-Tavernier M, *et al.* Evaluation of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria screening by flow cytometry through multicentric interlaboratory comparison in four countries. *Am J Clin Pathol* 2015 ; 144 (6) : 858-68. doi: 10.1309/AJCPWMWJ7XDNQ3SN.

[16] Cazin B, Divine M, Leprêtre S, *et al.* High efficacy with five days schedule of oral fludarabine phosphate and cyclophosphamide in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2008 ; 143 (1) : 54-9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07309.x.

[17] Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, *et al.* Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood* 2011 ; 117 : 6109-19. doi: 10.1182/blood-2010-11-31707.

[18] Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, *et al.* International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007 ; 21 (5) : 956-64.

[19] Maloum K, Charlotte F, Divine M, Cazin B, Lesty C, Merle-Beral H. A comparison of the sensitivity of flow cytometry and bone marrow biopsy in the detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006 ; 91 : 860-1.