

Méthodes d'évaluation de la maladie résiduelle dans le myélome multiple



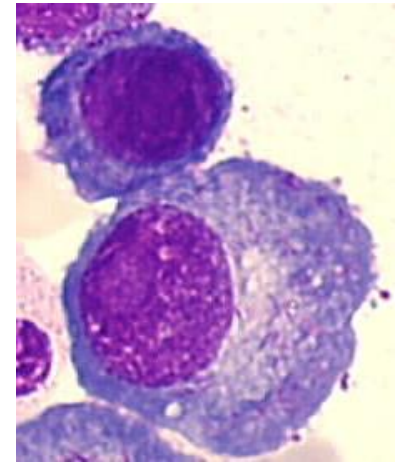
Interrégionales d'Hématologie de l'Est

Nancy, 01 février 2020

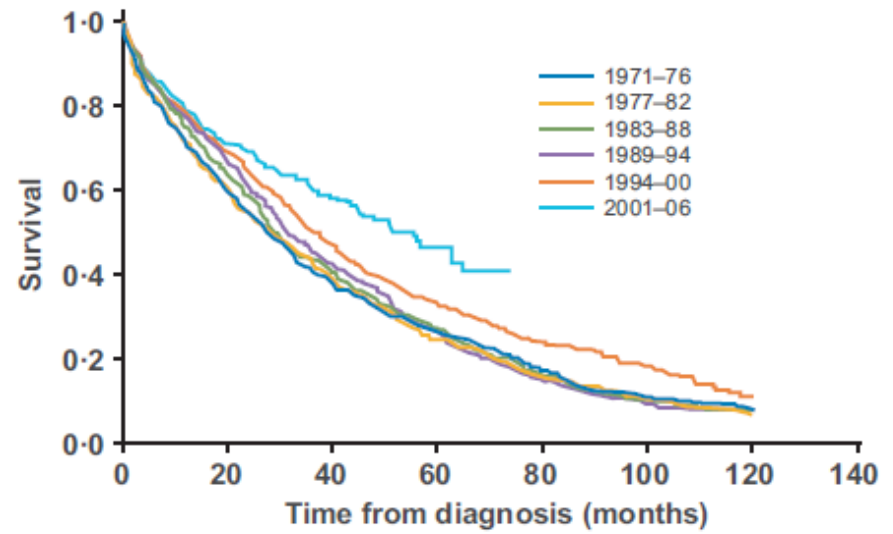
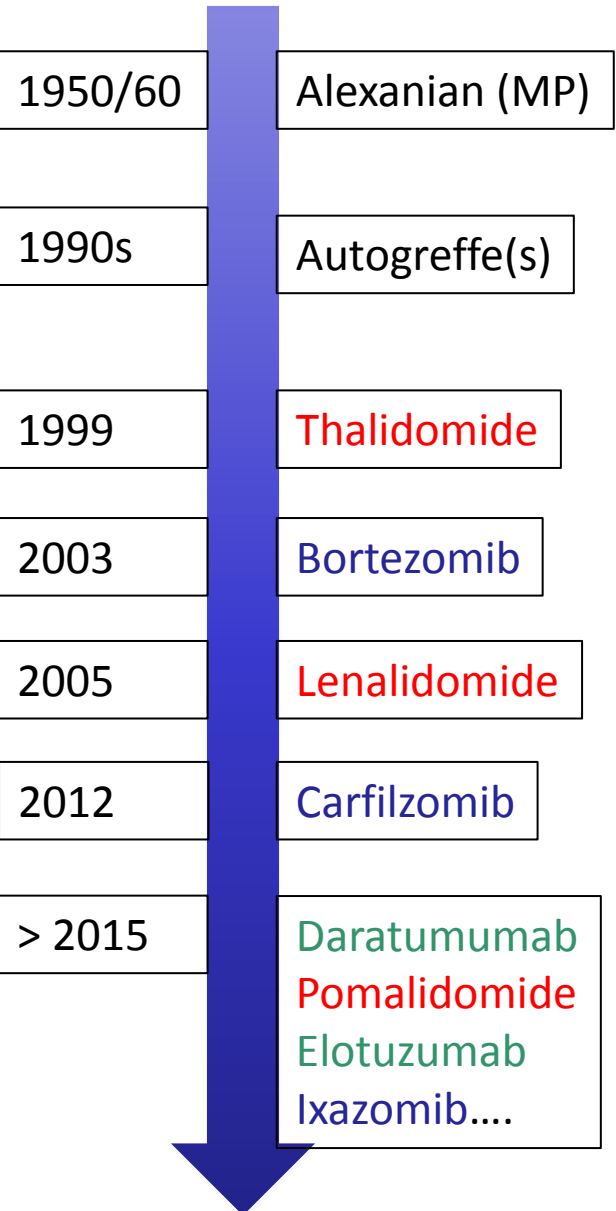
Dr Caroline Mayeur-Rousse
PH Hématologie biologique
CHU de Strasbourg

Myélome Multiple

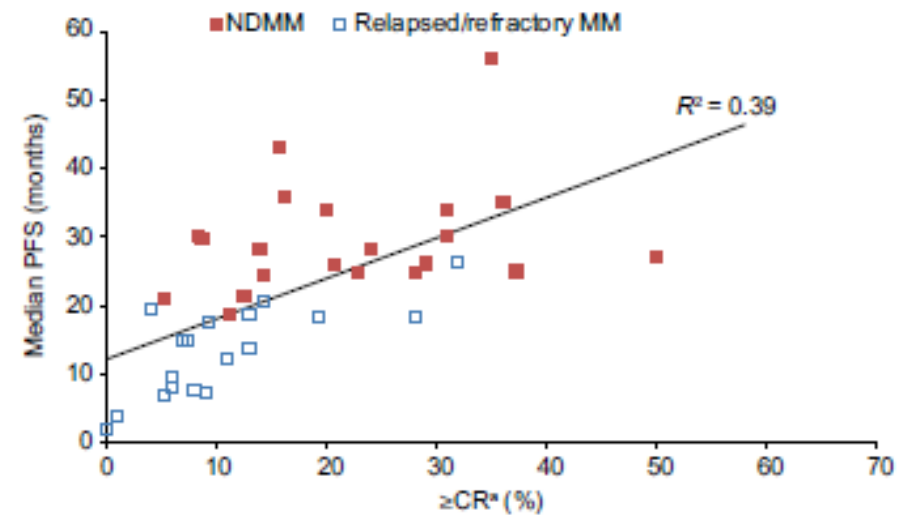
- **10 à 15% des hémopathies malignes**
seconde hémopathie maligne après les LNH
- **Incidence :**
 - environ 6000 nouveaux cas /an en France
 - 20000 nouveaux cas/an aux USA
- **Maladie de l'adulte** après 40 ans
âge moyen au Dg : 65 ans
- **Prolifération plasmocytaire maligne**
 - Expansion monoclonale de plasmocytes
 - Accumulation dans la MO
 - Sécrétion d'une immunoglobuline complète ou non



Des bouleversements thérapeutiques récents

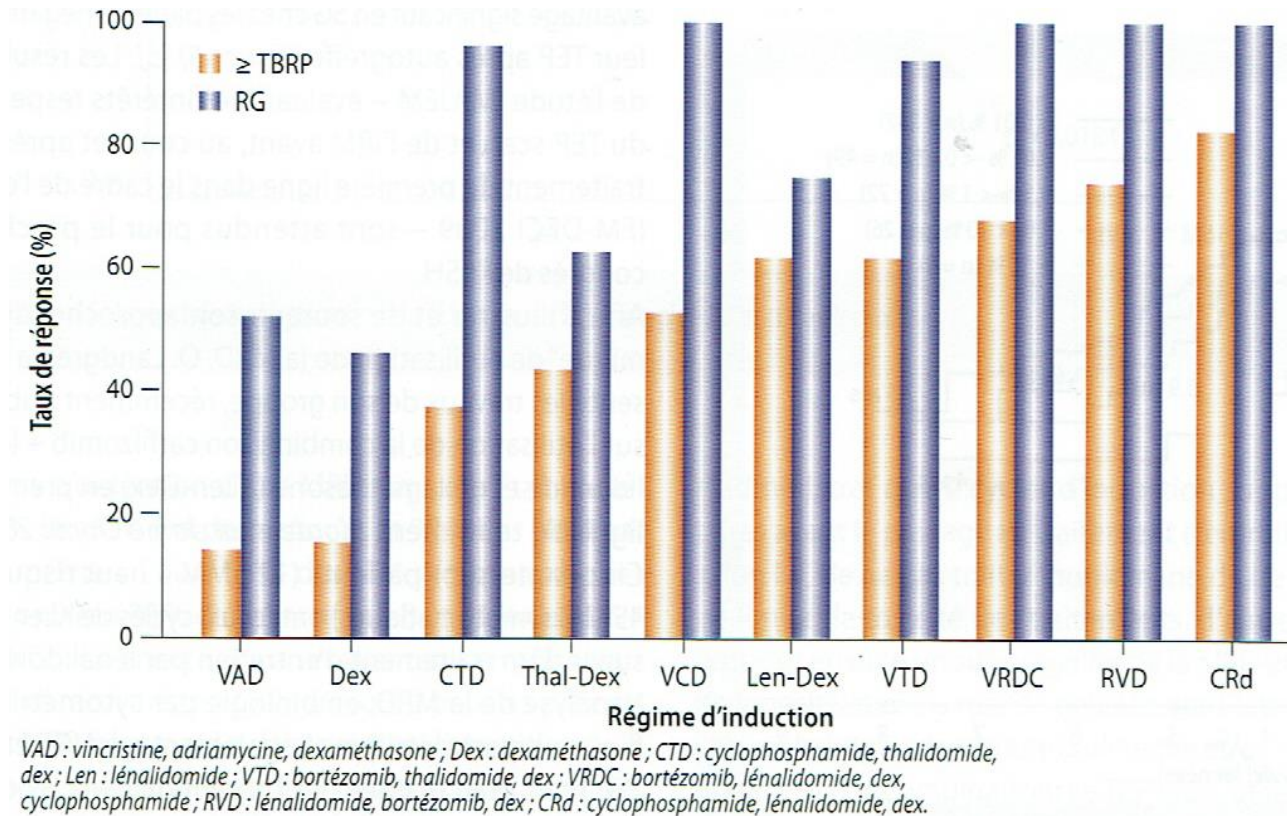


Richardson, BJH, 2011



Landgren, JIM, 2017

Des réponses thérapeutiques de plus en plus fréquentes



De nouveaux critères de réponse aux traitements (IMWG 2016)

RC stringente

RC + ratio K/L normal et IHC -

Réponse Complète

IF – et plasmocytose <5% et pas de plasmocytome

Très Bonne RP

EPPS et U – mais IF + ou

↳ >90% IgS et IgU (<100mg/24h)

Réponse Partielle

↳ >50% IgS et >90% IgU
(<200mg/24h)

↳ >50% CLL ou plasmocytose

MRD négative par NGS (10^{-5})

MRD négative par CMF (10^{-5})

MRD négative par PET-Scan

Progression

↗25% IgS et/ou IgU
ou plasmocytose

Nouvelles lésions
osseuses

HyperCa²⁺

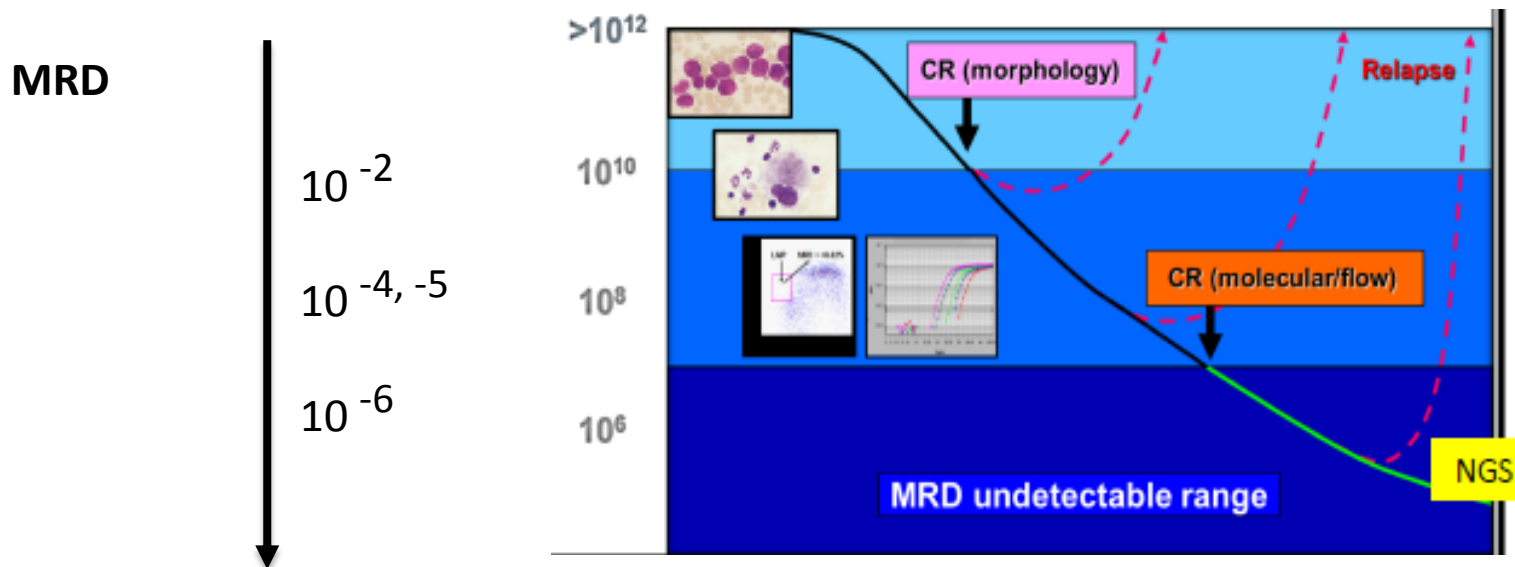
Maladie
stable

Concept de MRD biologique

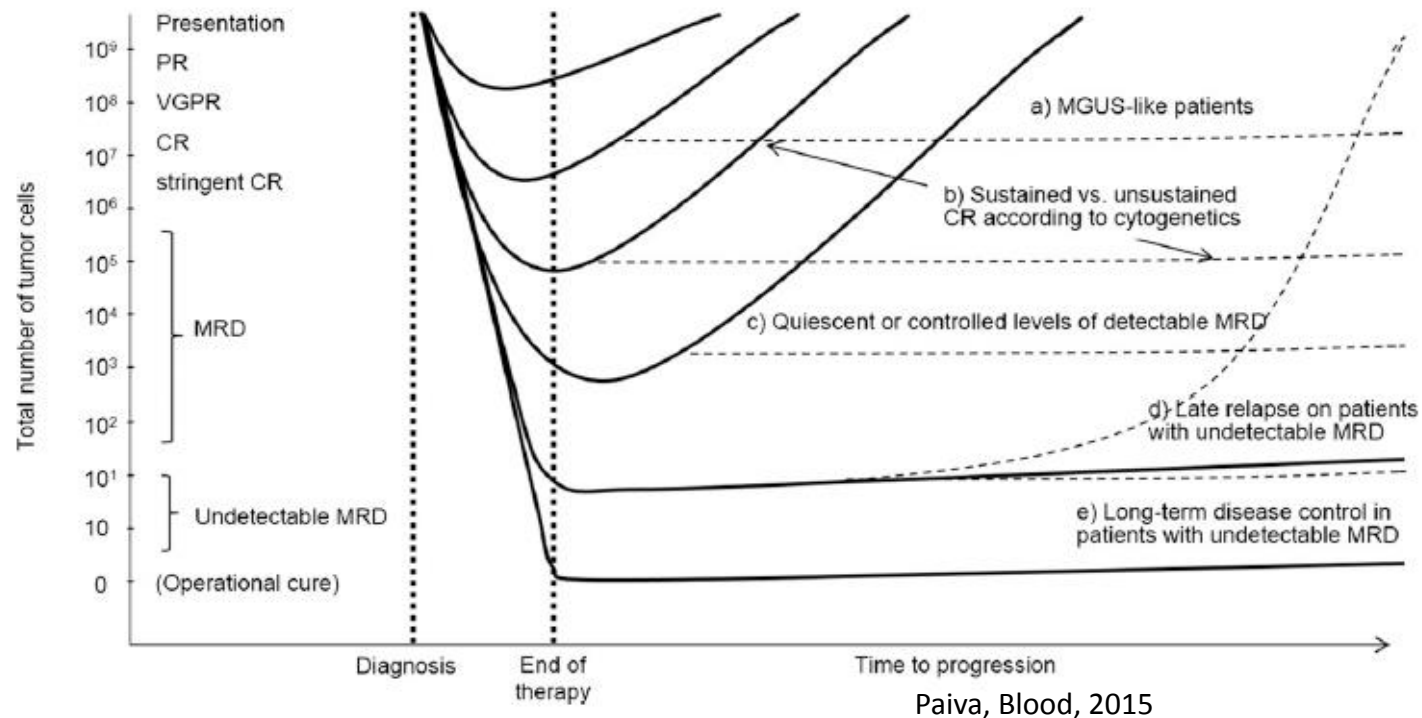
Détection d'une cellule maligne résiduelle au sein de (très) nombreuses cellules normales



Différentes techniques, de sensibilité différente

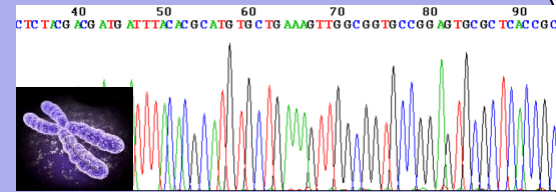


Impact de la profondeur de la réponse

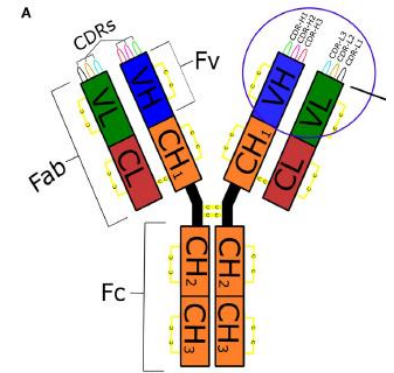


- Approche moléculaire par NGS basée sur les mécanismes des réarrangements des gènes des Ig
- Approche cellulaire par CMF, basée sur les caractéristiques de l'Ig et des constituants membranaires plasmocytaires

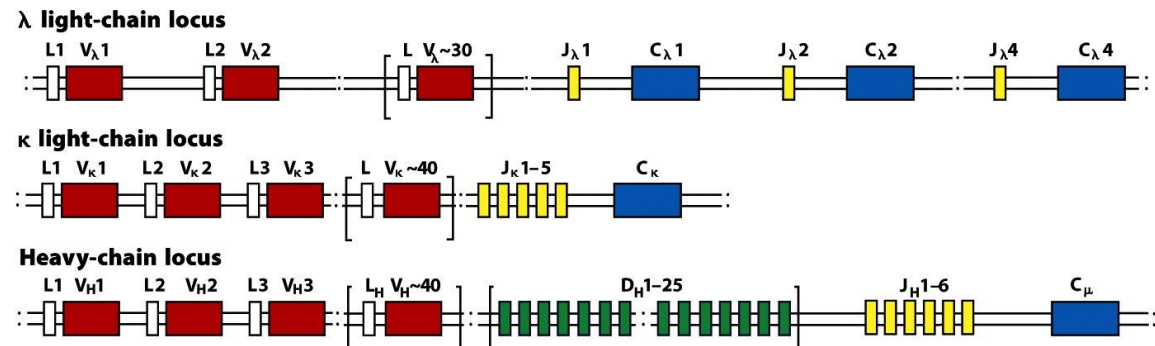
MRD myélome par NGS

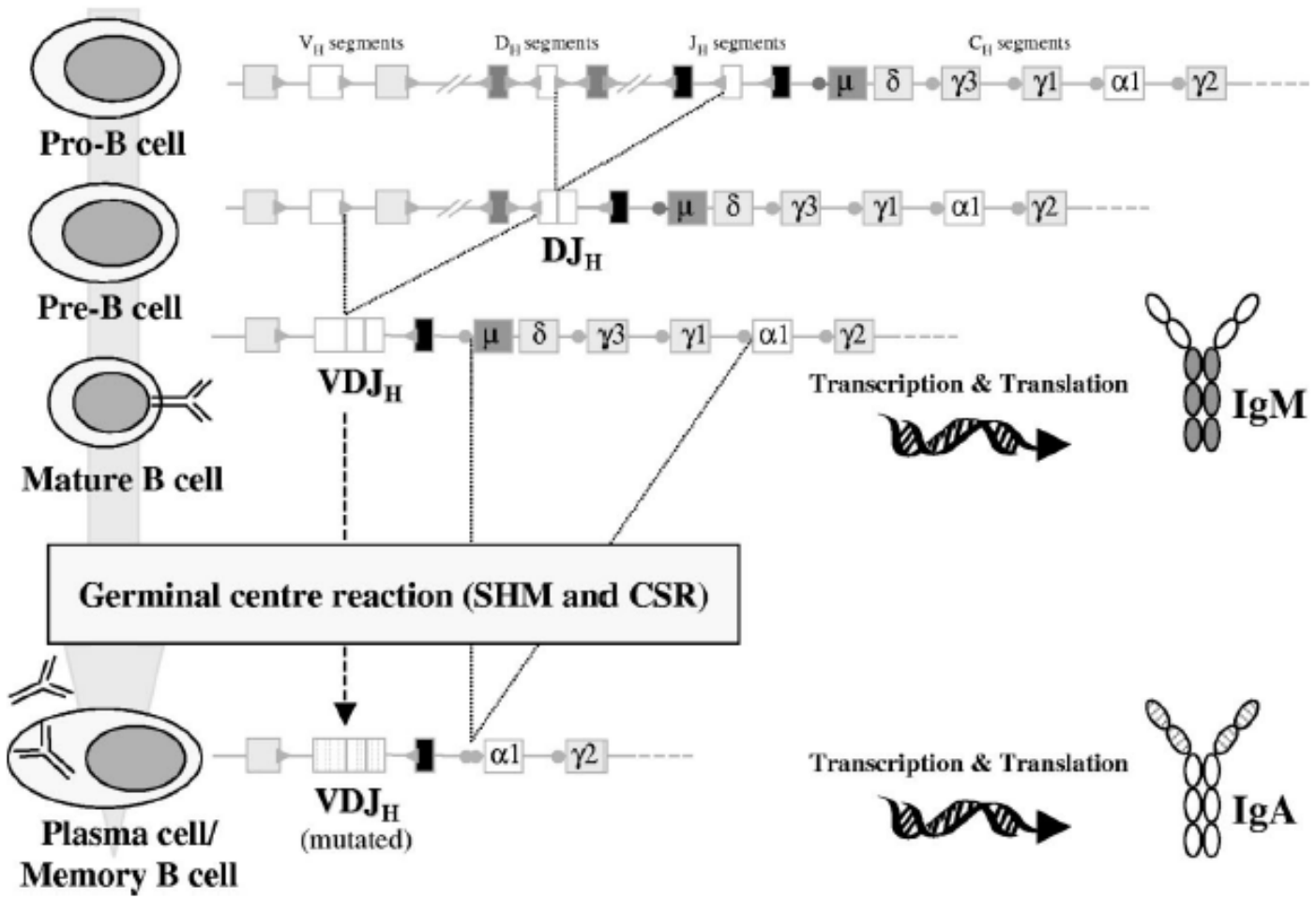


- Approche moléculaire, basée sur les mécanismes des réarrangements des gènes des Ig = quantification d'une séquence CONNUE
- Chaque lymphocyte B/plasmocyte possède une Ig unique
 - 2 chaînes lourdes (IGH)
 - 2 chaînes légères (IGL) kappa ou lambda
- Chaque lymphocyte B/plasmocyte possède une séquence d'ADN unique
 - Locus IGH : chr.14q32, 4 régions V, D, J, C
 - Locus IGL : chr.2 (κ), chr.22 (λ), 3 régions V, J, C



Kovaltsuk, Frontiers in Immunology, 2017





Gonzalez, Blood, 2007

- 1) Recombinaisons IgH : D/J puis V/DJ
 - enzymes RAG1/2
 - enzyme TdT : rajout de nucléotides au hasard entre VD/DJ
- 2) Recombinaisons IgL :
 - même processus mais pas de domaine D

→ Un clonotype unique par plasmocyte

Principe de la MRD myélome par NGS

- 1^{ère} étape = CALIBRATION càd détermination et séquençage du clonotype myélomateux au diagnostic en utilisant des primers locus spécifiques IgH ($V_H D J_H$, $D J_H$) et IgL couvrant tous les réarrangements possibles

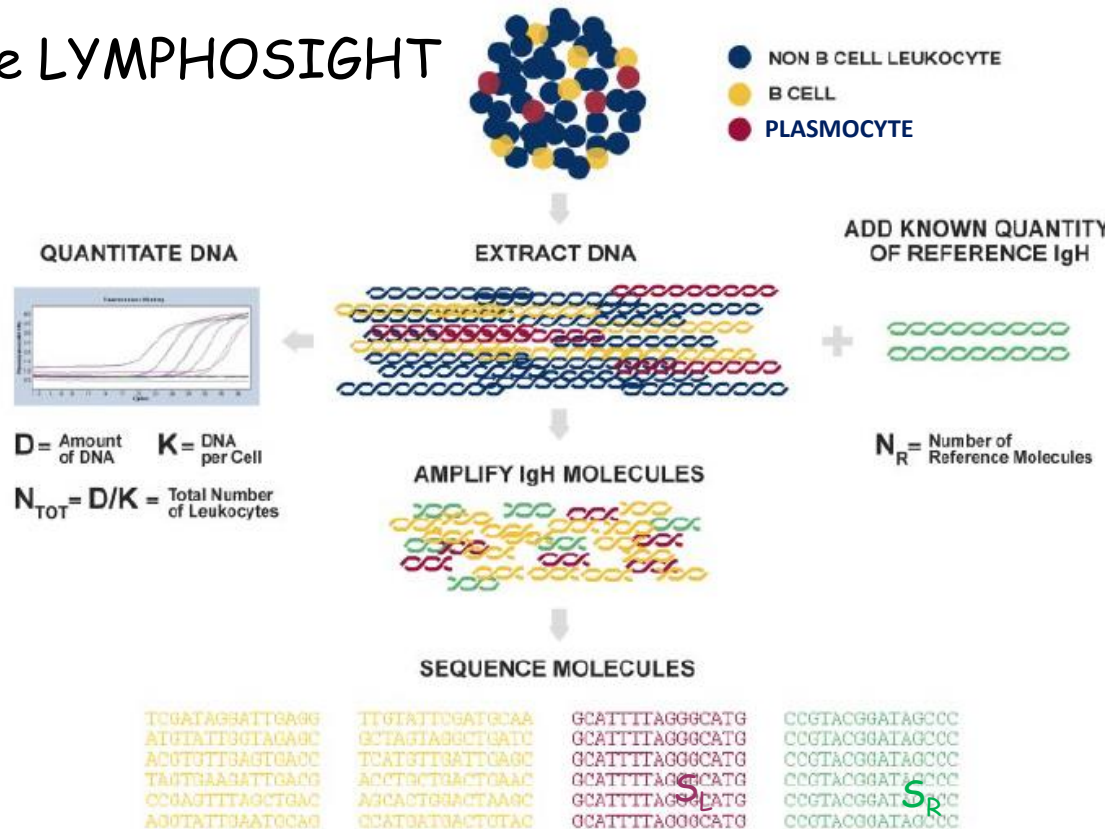
- 2^{ème} étape = SUIVI, méthode LYMPHOSIGHT

- Estimation du nombre de leucocytes totaux

- Ajout d'1 quantité connue d'ADN de référence

- Amplification/Séquencage (> 2 S_L identiques du clonotype)

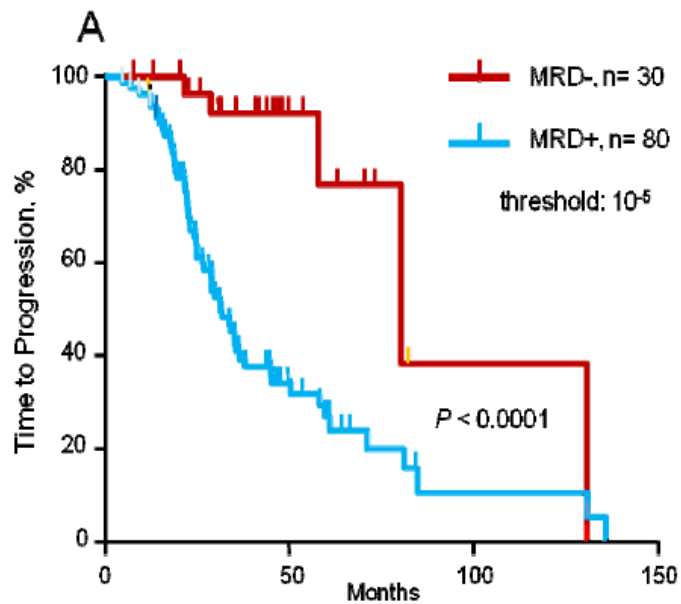
- Calcul du nombre de plasmocytes résiduels par leucocyte



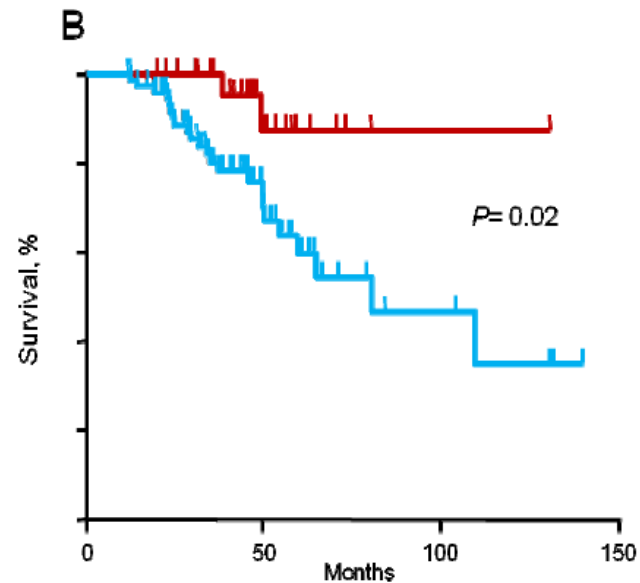
$$(S_L \times F) / N_{TOT}$$

où $F = N_R / S_R$

Impact clinique



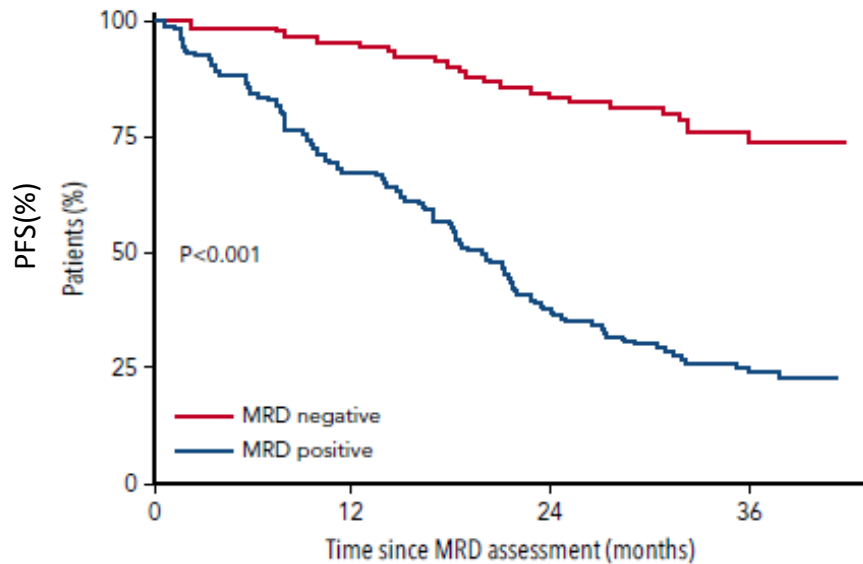
TTP selon le statut MRD (10^{-5})
après la 1^{ère} ligne de ttmt, >TBRP



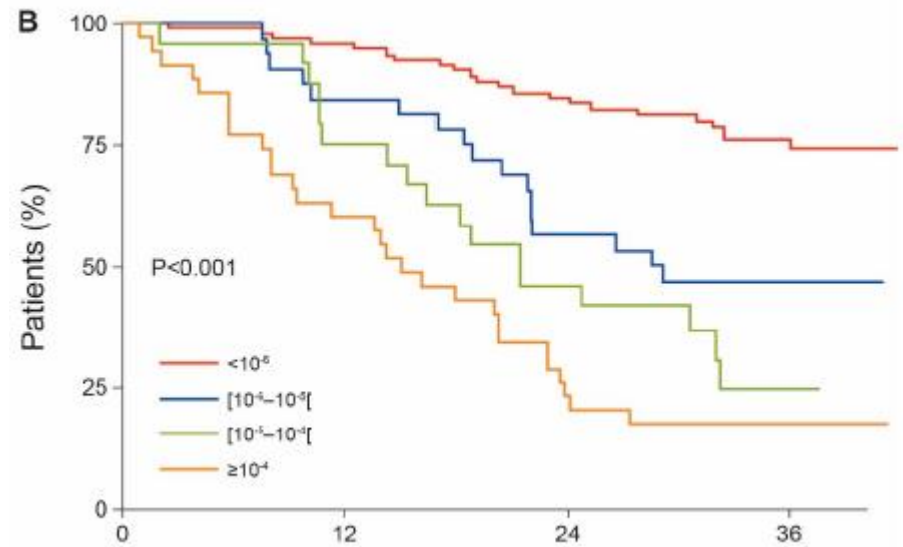
OS selon le statut MRD (10^{-5})
après la 1^{ère} ligne de ttmt, > TBRP

Martinez-Lopez, Blood, 2014

Impact clinique



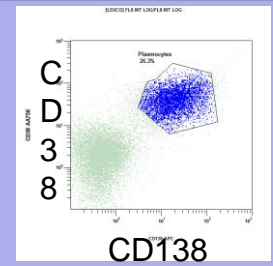
PFS selon le statut MRD (10^{-6}) à 12 mois maintenance (patients au - en TBRP)



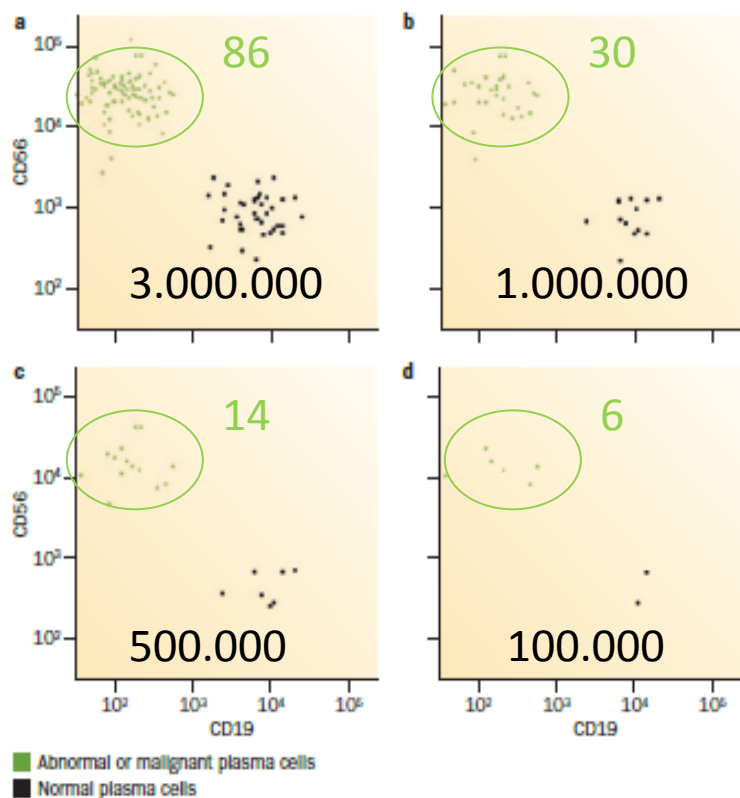
PFS selon la profondeur MRD à 12 mois maintenance (patients au - en TBRP)

Perrot, Blood, 2018

MRD myélome par CMF



- Approche cellulaire, basée sur la recherche de profils phénotypiques aberrants +/- de monotypie = quantification d'évènements rares
- MRD positive si :
 - Cluster d'au moins 20 évènements (Hedley, Int J Laboratory Hematology 2013, Arroz M, et al. Cytometry Part B 2015)
 - Acquisition d'un nombre suffisant d'évènements totaux

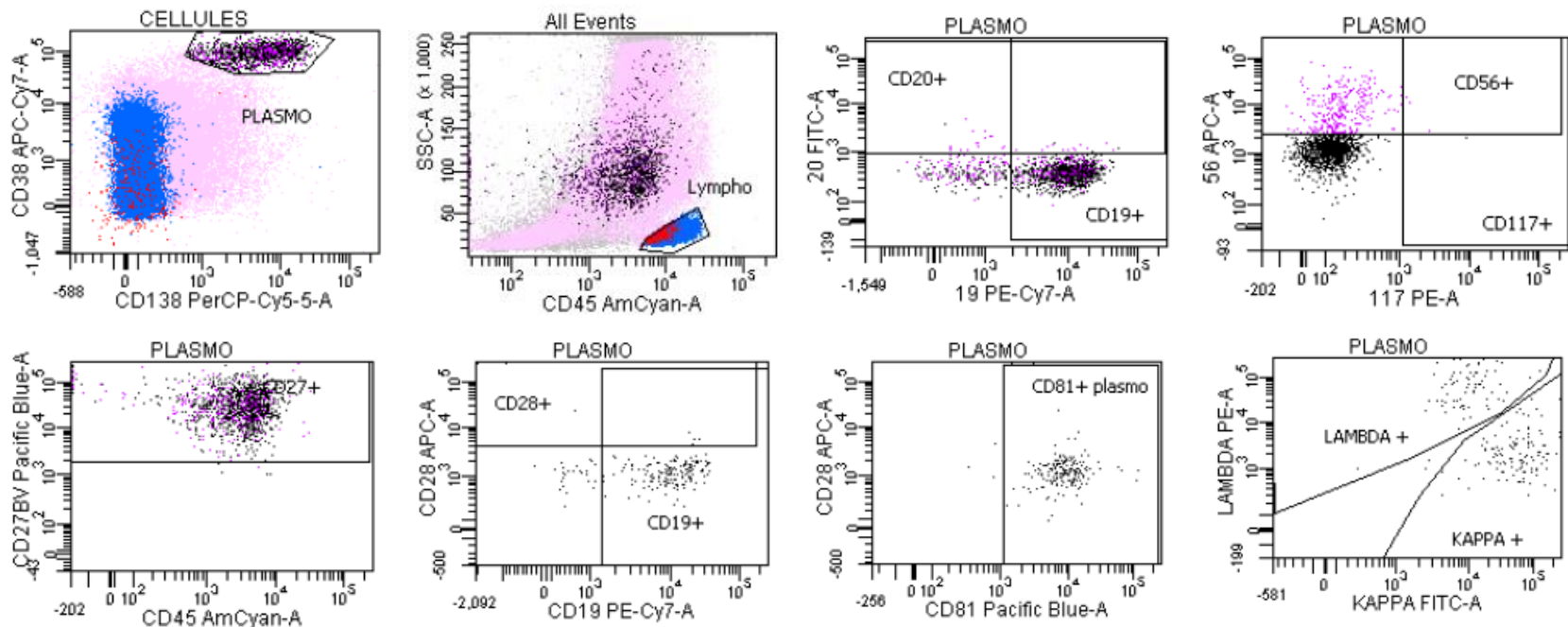


Profil phénotypique des plasmocytes normaux

Combinaison utilisée à Strasbourg

	FITC	PE	PerCPCy5.5	PeCy7	APC	APCH7	BV421/PB	V500
Plasmo 1	CD20	CD117	CD138	CD19	CD56	CD38	CD27	CD45
Plasmo 2	cKappa	cLambda	CD138	CD19	CD28	CD38	CD81	CD45

CD38+ CD138+ CD45+faible CD19+ CD20- CD56- CD117- CD27+ CD28- CD81+ polytypiques (intra)



Profil phénotypique des plasmocytes myélomateux

- recherche de profils phénotypiques aberrants
- restriction d'expression chaîne légère intracytoplasmique (monotypie)

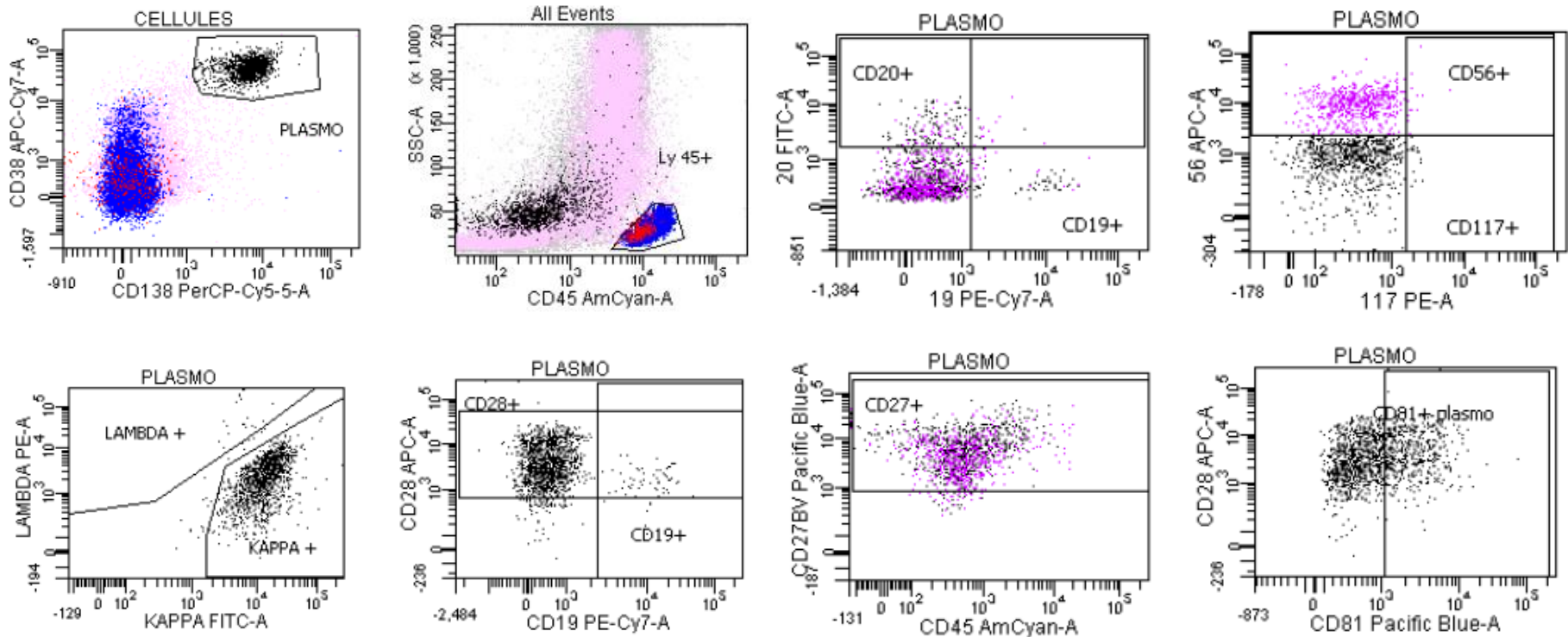
Antigen	Normal expression profile (percentage expression on normal plasma cells)	Abnormal expression profile	Percentage of myeloma cases with abnormal expression	Requirement for diagnosis and monitoring
CD19	Positive (>70%)	Negative	95%	Essential
CD56	Negative (<15%)	Strongly positive	75%	Essential
CD117	Negative (0%)	Positive	30%	Recommended
CD20	Negative (0%)	Positive	30%	Recommended
CD28	Negative/weak (<15%)	Strongly positive	15-45%	Recommended
CD27	Strongly positive (100%)	Weak or negative	40-50%	Recommended
CD81	Positive (100%)	Weak or negative	Not published	Suggested
CD200	Weakly positive	Strongly positive	Not published	Suggested

Antigen	Aberrant pattern	% of abnormal expression cases
CD19	-	96%
CD20	dim +	17-30%
CD27	- or dim +	40-68%
CD28	+	15-45%
CD33	+	18%
CD38	dim +	80%
CD45	-	73%
CD54	dim +	60-80%
CD56	++	60-75%
CD81	- or dim +	55%
CD117	+	30-32%
CD200	+ / ++	≥70%
CD307	++	NA

Flores-Montero, Cytometry Part B, 2016

Exemple de profil myélomateux

- Plasmocytes monotypiques kappa CD19- CD28+ CD27+f CD81-/+f CD56+partiel CD45-



MRD myélome par CMF

Exemples de panels proposés dans la littérature

- Euroflow : panel 8C 2 tubes (« NGF »)

	FITC	PE	PerCPCy5.5	PeCy7	APC	APC C750	BV421	BV510
Tube1	CD38 (ME)	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	CD138	CD27
Tube2	CD38 (ME)	CD56	CD45	CD19	cKappa	cLambda	CD138	CD27

- Euroflow : panel 10C 1 tube

	FITC	PE	PerCPCy5.5	PeCy7	APC	AF700	APC C750	BV421	BV510	BV605
Tube1	CD38 (ME)	CD56	cLambda	CD19	CD117	CD81	cKappa	CD138	CD27	CD45

- IFM : panel 7C 1 tube

	FITC	PE	PerCPCy5	PeCy7	APC	APC H7	V450
Tube1	cLambda	CD56/28	CD138	CD19	cKappa	CD45	CD38

- MSKCC : panel 10C 1 tube

	FITC	PE	PerCPCy5.5	PeCy7	APC	APCR700	APC H7	PB	BV510	BV605
Tube1	cKappa	cLambda	CD117	CD19	CD138	CD56	CD45	CD81	CD38	CD27

→ Quelques points consensuels

- Prélèvement frais (24 à 48h max) sur EDTA ou héparine
- Marquer au moins 3 à 5 millions de cellules/tube (Macrolyse+++)
- Analyser au moins 2 millions de cellules
- Contrôler l'hémodilution (cytométrie ou cytologie)
- Ac minimums : CD38/138/19/45/56

Strasbourg cas 1

Patient 67 ans, protocole Cassiopée bras VTD, Dara
Evaluation S105 (11/2018)

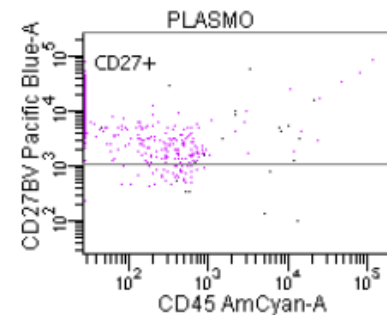
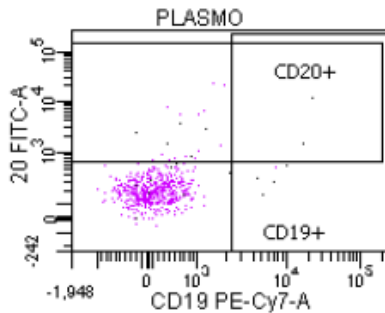
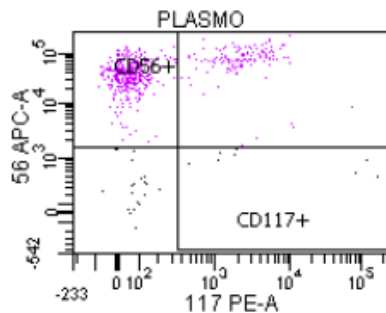
Nbre d'évènements totaux : 3.225.000

Nbre de plasmocytes totaux : 546

Nbre de plasmocytes MM: 518

MRD + 0,02 % ($2 \cdot 10^{-4}$)

kappa lambda non
contributif



Strasbourg cas 2

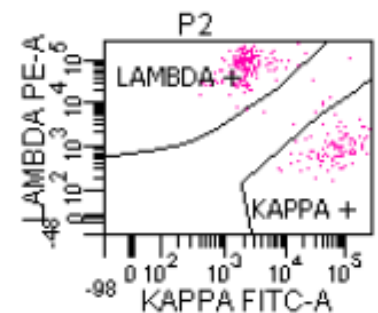
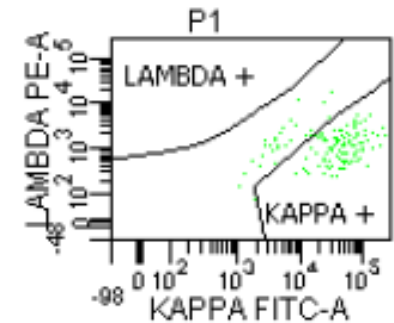
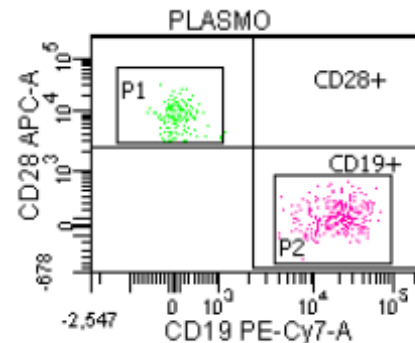
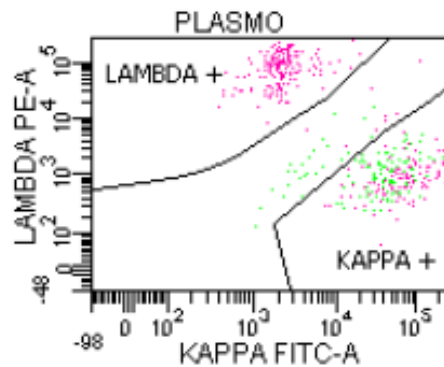
Patient 56 ans, protocole Cassiopée bras VTD, obs
Evaluation S25 (09/2018)

Nbre d'évènements totaux : 2.408.477

Nbre de plasmocytes totaux : 408

Nbre de plasmocytes MM: 137

MRD + 0,006 % (6.10^{-5})



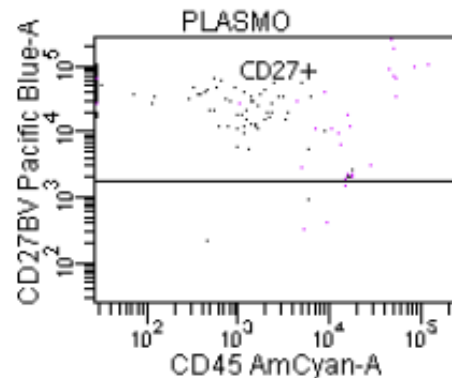
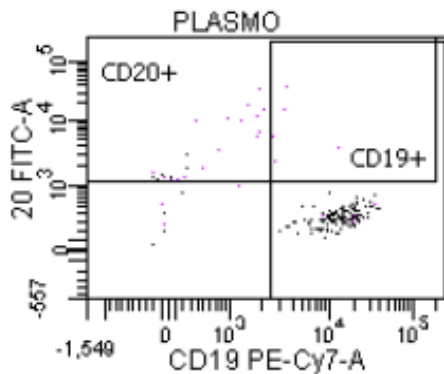
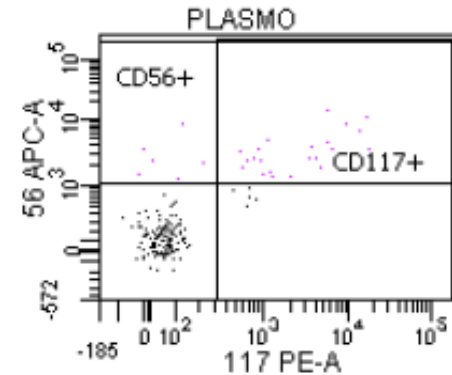
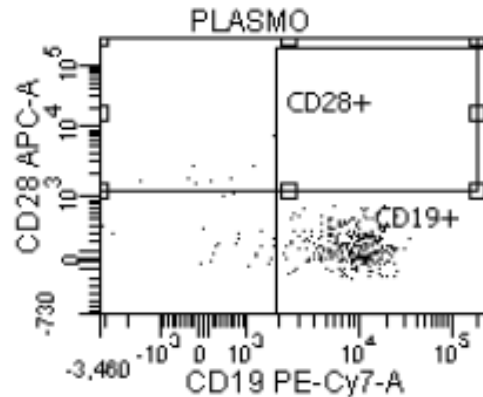
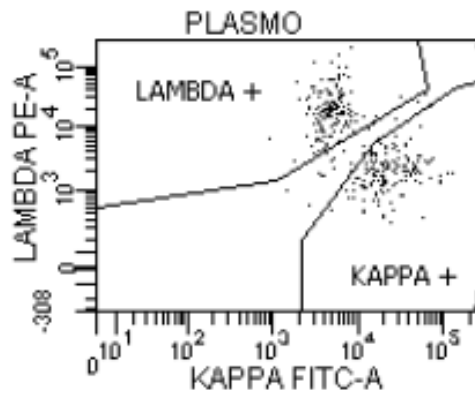
Strasbourg cas 3

Patient 68 ans, protocole Cassiopée
bras D VTD, obs
Evaluation S105 (01/2019)

Nbre d'évènements totaux : 1.246.554

Nbre de plasmocytes totaux : 172

MRD : < 0,002 % (2.10^{-5})



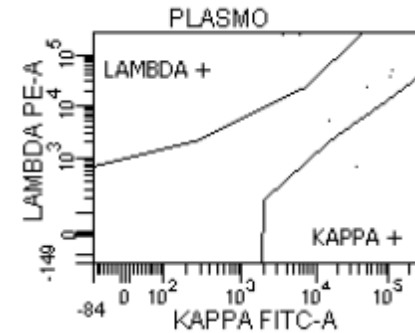
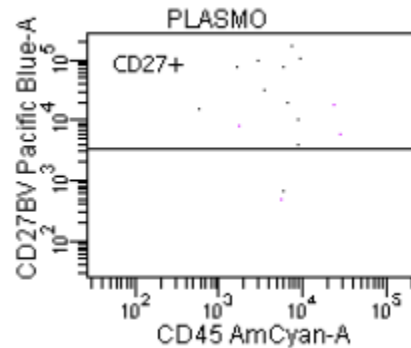
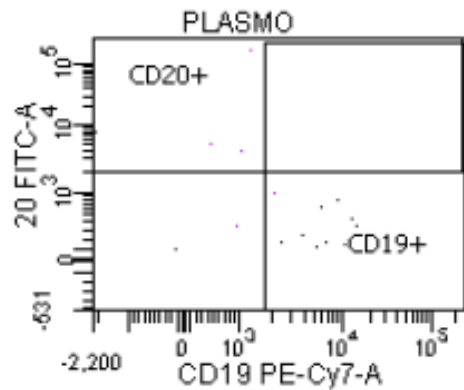
Strasbourg cas 4

Patiente 59 ans, protocole
Cassiopée bras VTD, Dara
Evaluation S105 (03/2019)

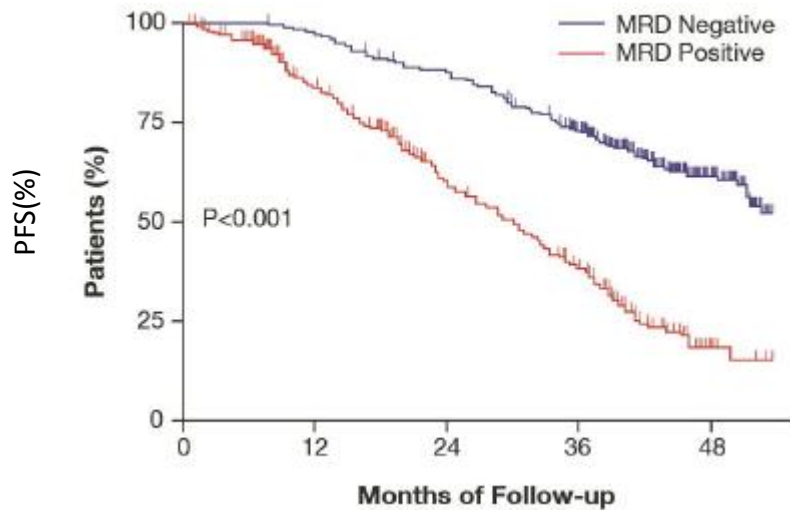
Nbre d'évènements totaux : 2.881.624

Nbre de plasmocytes totaux : 16

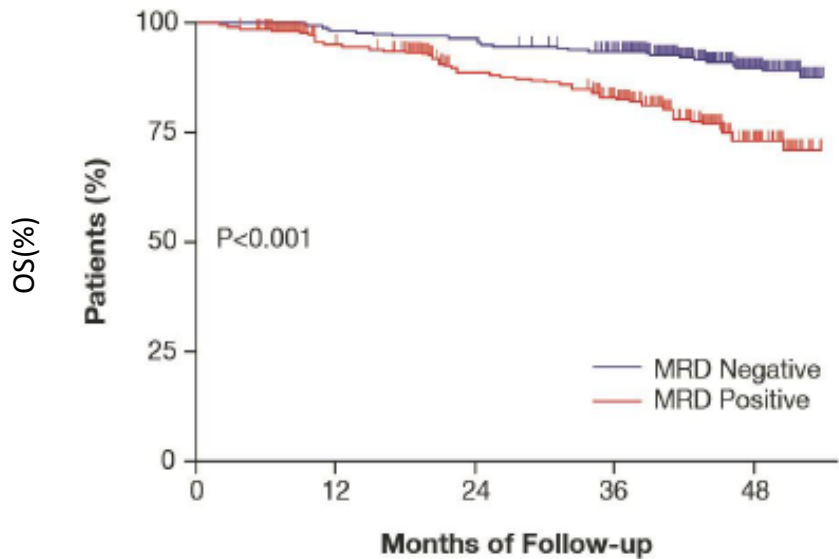
MRD : < 0,001 % (10^{-5})



Impact clinique



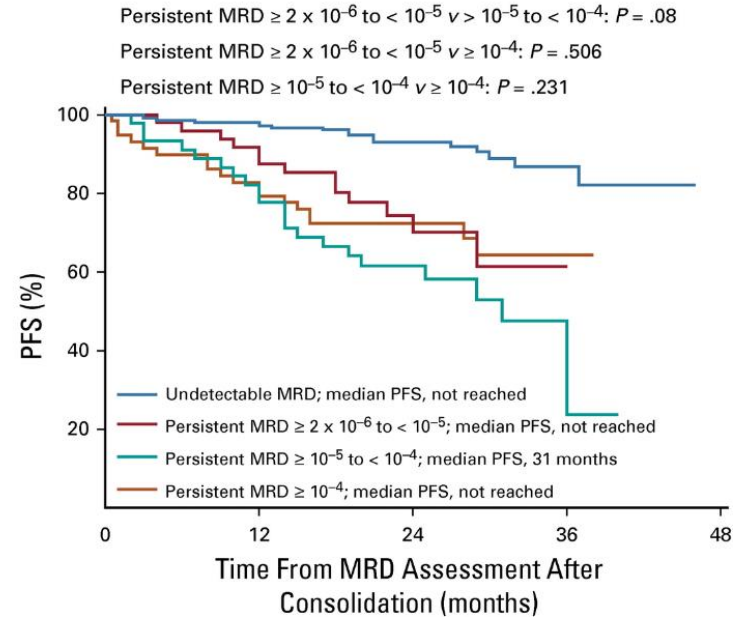
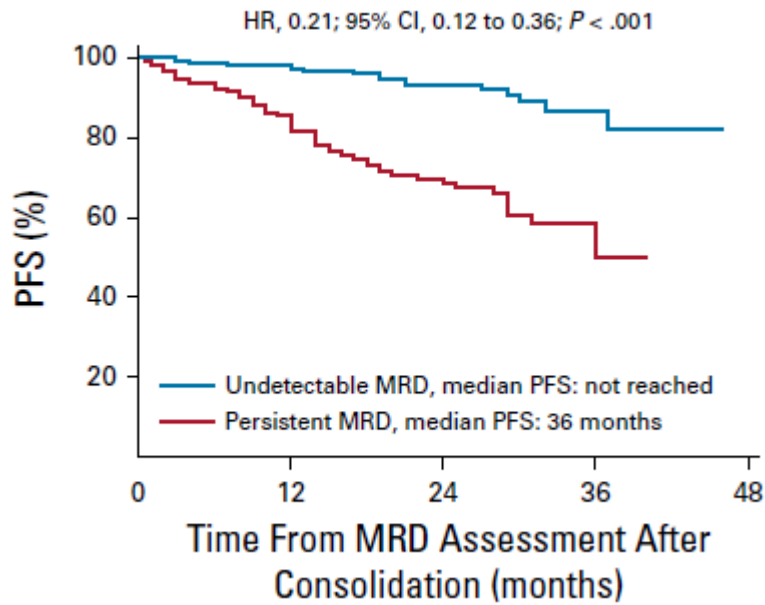
PFS selon le statut MRD (10^{-4})



OS selon le statut MRD (10^{-4})

Attal, NEJM, 2017

Impact clinique



Paiva, JCO, 2019

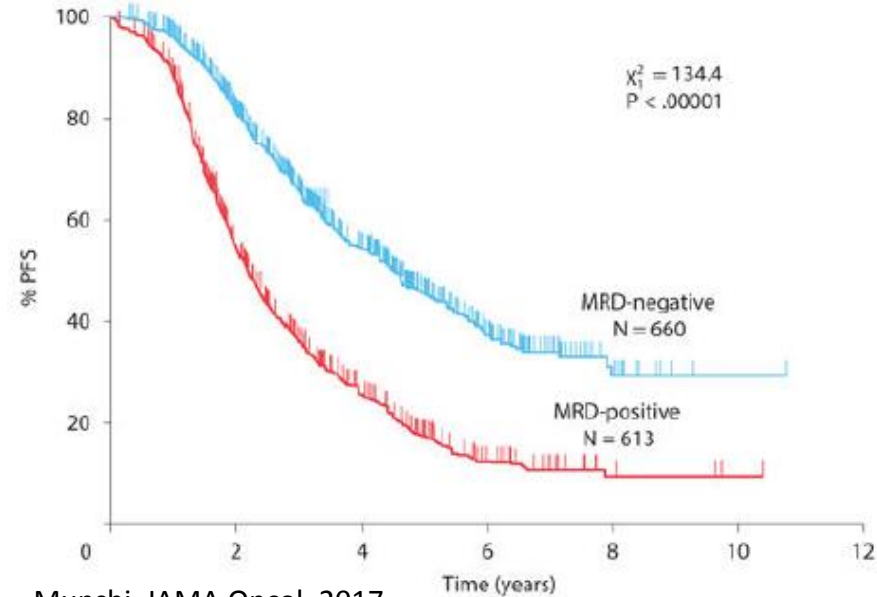
PFS selon le statut MRD ($2 \cdot 10^{-6}$)

PFS selon la profondeur de la MRD

Conclusion (1)

	NGS	CMF
Faisabilité	~97%	~100%
Disponibilité	Qq centres	Nbx centres
Plvt au diagnostic	INDISPENSABLE	Non requis
Délai technique	10 à 14 jours	Qq heures
Coût	2 RIHN3270 au Dg (1700 E) RIHN3270 en suivi (850 E)	B300 (81 E) BHN100/Ac (27 E)
Sensibilité	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ à 10 ⁻⁶
Quantification	Indirecte	Directe
Plvt frais	NON (congélation)	OUI
Distribution patchy	Impact	Impact
Analyses d'autres populations	NON	OUI
Standardisation	?	En cours...

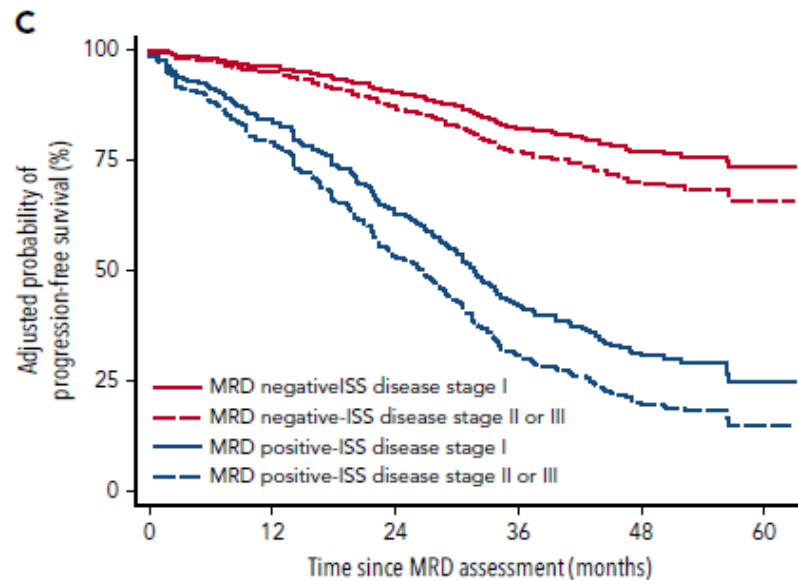
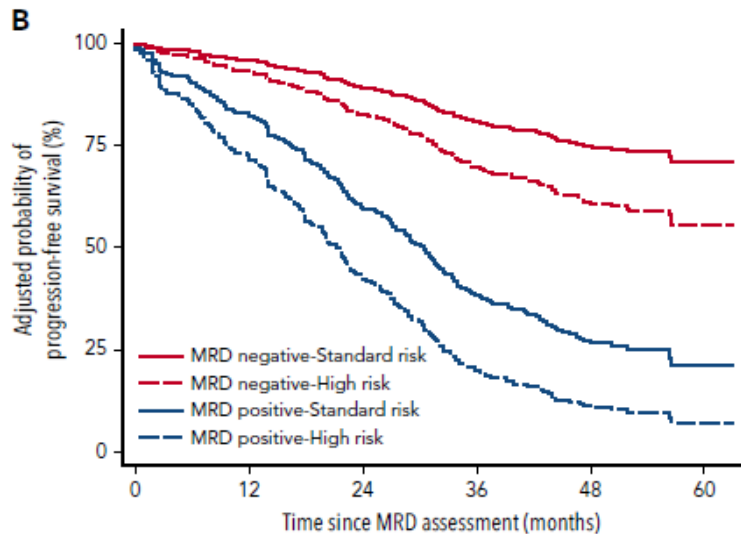
Conclusion (2)



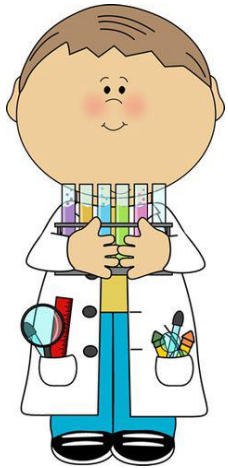
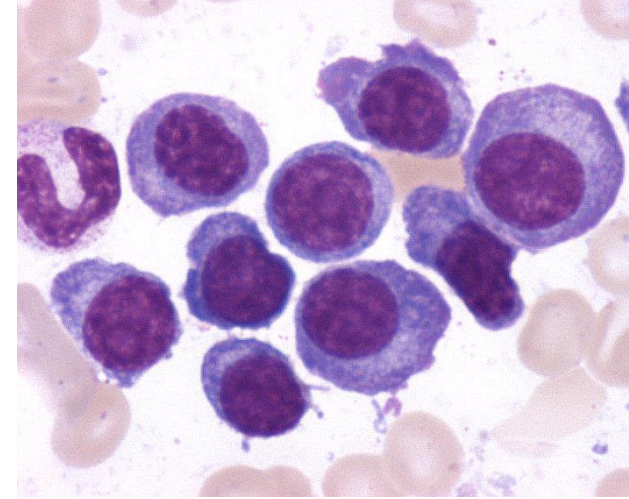
Munshi, JAMA Oncol, 2017

MRD négative par CMF ou NGS
 critère pronostique validé pour PFS et OS,
 indépendamment du statut cytogénétique
 et de l'ISS

Choix de la technique ?



Perrot, Blood, 2018



Méthodes d'évaluation de la maladie résiduelle dans le myélome multiple

MERCI pour votre attention



Interrégionales d'Hématologie de l'Est

Nancy, 01 février 2020

Dr Caroline Mayeur-Rousse
PH Hématologie biologique
CHU de Strasbourg