

Suivi de maladie résiduelle dans les LAM

Quelles évolutions en pratique ?

Florian Renosi

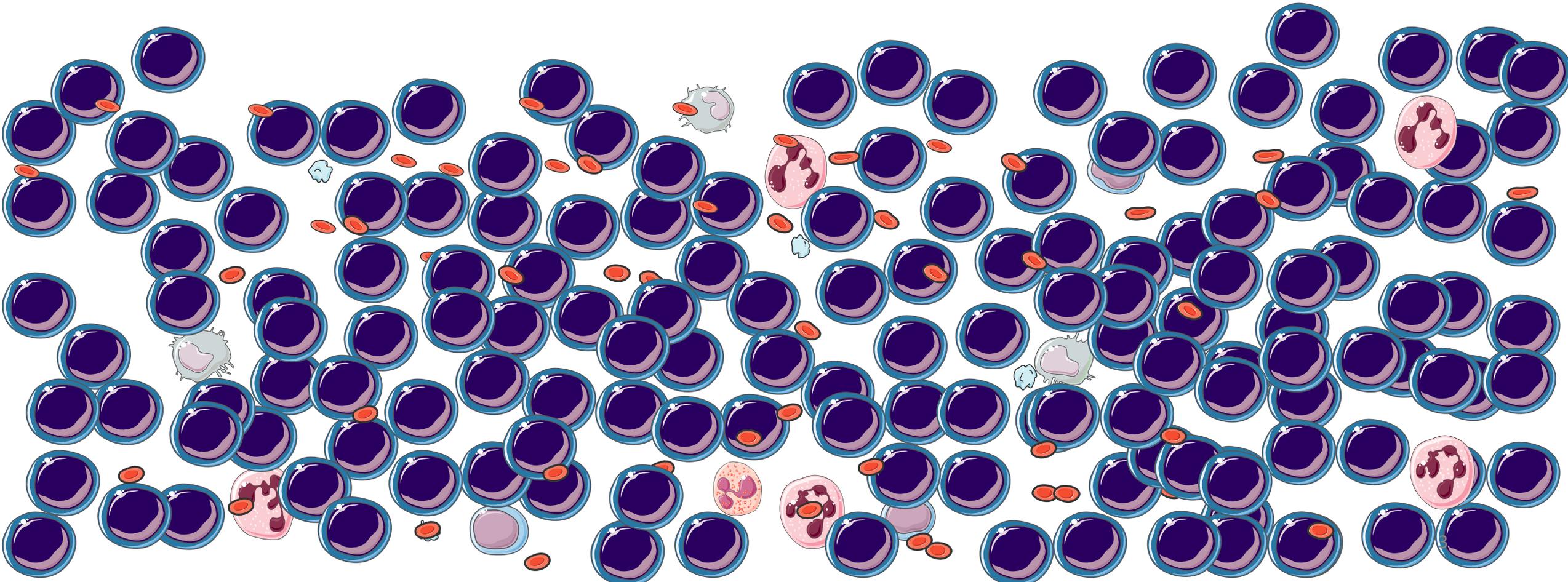
Laboratoire d'Onco-Hématologie Moléculaire

UMR1098 - RIGHT

Définition de la MRD



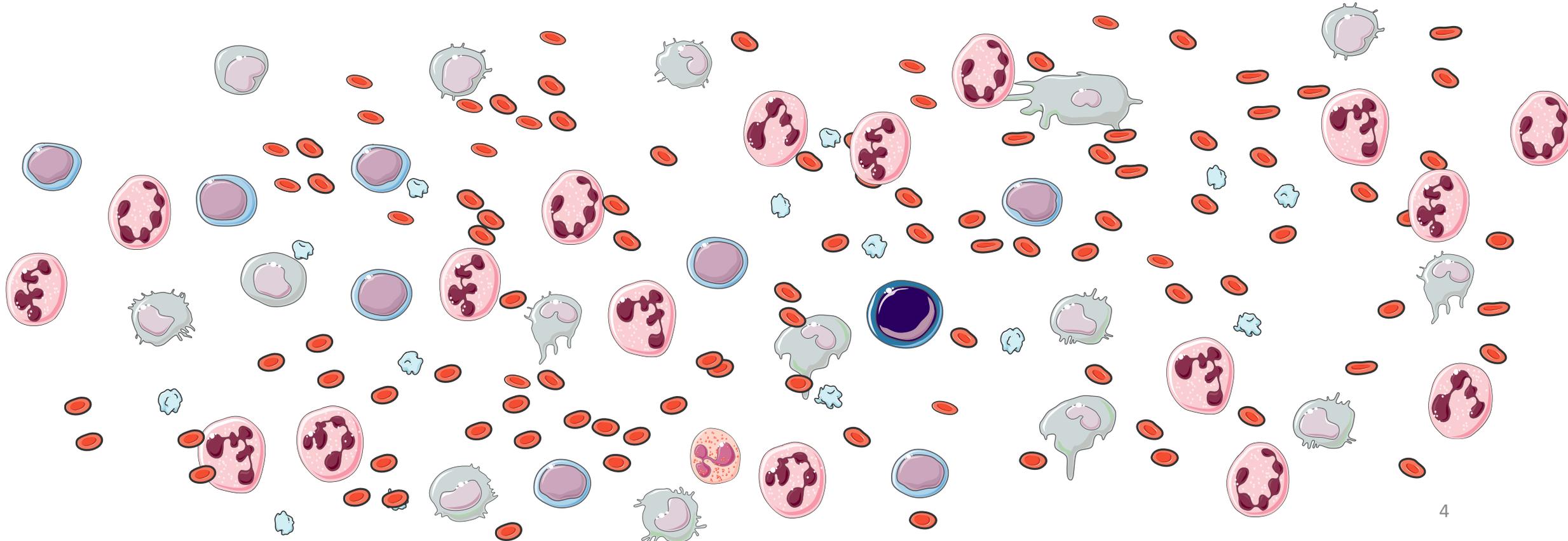
LAM avant traitement



LAM après traitement

Recherche de cellules persistantes : contingent de cellules tumorales résiduelles

- Signe d'une résistance à la chimiothérapie => prédictif de la rechute
- Justifie d'intensifier/changer/reprendre le traitement => adaptation thérapeutique



M.R.D.

Measurable Residual Disease

- Anciennement = **Minimal** Residual Disease
- En français = **Maladie ResiDuelle**

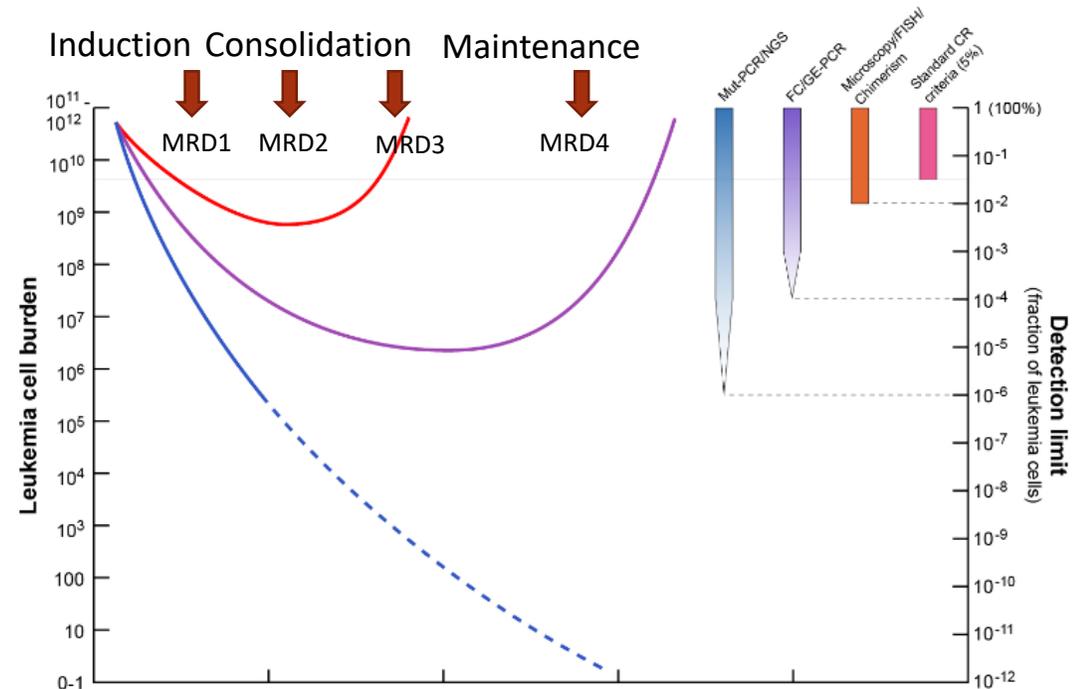
MRD négative

Ne signifie pas éradication de la maladie



Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party

Gerrit J. Schuurhuis,¹ Michael Heuser,^{2,*} Sylvie Freeman,^{3,*} Marie-Christine Béné,⁴ Francesco Buccisano,⁵ Jacqueline Cloos,^{1,6} David Grimwade,⁷ Torsten Haferlach,⁸ Robert K. Hills,⁹ Christopher S. Hourigan,¹⁰ Jeffrey L. Jorgensen,¹¹ Wolfgang Kern,⁸ Francis Lacombe,¹² Luca Maurillo,⁵ Claude Preudhomme,¹³ Bert A. van der Reijden,¹⁴ Christian Thiede,¹⁵ Adriano Venditti,⁵ Paresh Vyas,¹⁶ Brent L. Wood,^{17,18} Roland B. Walter,^{17,19} Konstanze Döhner,^{20,†} Gail J. Roboz,^{21,†} and Gert J. Ossenkoppele¹



Place du suivi de maladie résiduelle dans les LAM

- **Complexe**
 - Hétérogénéité de la population tumorale
 - La moelle fonctionnelle mature porte certaines anomalies clonales
 - Rôle décisionnel moins codifié que pour les LAL

Comment ?

CMF, Biologie moléculaire

Plusieurs approches

- **Quelles techniques, quels marqueurs ?**

- Similaire aux LAL, sauf pour la clonalité IGH/TCR (pas de réarrangement similaire aux VDJ)

Biologie moléculaire	Cytométrie en flux
seules les cellules tumorales portent le transcrit : transcrits de fusion (PML::RARA, RUNX1::RUNX1T1, CBFβ::MYH11...), mutations NPM1 +/- autres ? WT1	+/- seules les cellules tumorales expriment des marqueurs atypiques

- **Contraintes :**

- Conceptuelles (leucémogénèse) : Cibler l'anomalie initiatrice de la leucémie (transcrits de fusion)
- Techniques : Etre suffisamment sensible
- Pratiques : identifier le marqueur/phénotype spécifique au diagnostic
- Possible sur le sang ou la moelle ?

Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN

Hartmut Döhner,¹ Andrew H. Wei,² Frederick R. Appelbaum,³ Charles Craddock,⁴ Courtney D. DiNardo,⁵ Hervé Dombret,⁶ Benjamin L. Ebert,⁷ Pierre Fenaux,⁸ Lucy A. Godley,⁹ Robert P. Hasserjian,¹⁰ Richard A. Larson,¹¹ Ross L. Levine,¹² Yasushi Miyazaki,¹³ Dietger Niederwieser,¹⁴ Gert Ossenkoppele,¹⁵ Christoph Röllig,¹⁶ Jorge Sierra,¹⁷ Eytan M. Stein,¹⁸ Martin S. Tallman,¹⁸ Hwei-Fang Tien,¹⁹ Jianxiang Wang,²⁰ Agnieszka Wierzbowska,²¹ and Bob Löwenberg²²

2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party

Michael Heuser,¹ Sylvie D. Freeman,² Gert J. Ossenkoppele,³ Francesco Buccisano,⁴ Christopher S. Hourigan,⁵ Lok Lam Ngai,³ Jesse M. Tetters,³ Costa Bachas,³ Constance Baer,⁶ Marie-Christine Béné,⁷ Veit Bücklein,⁸ Anna Czyz,⁹ Barbara Denys,¹⁰ Richard Dillon,¹¹ Michaela Feuring-Buske,¹² Monica L. Guzman,¹³ Torsten Haferlach,⁶ Lina Han,¹⁴ Julia K. Herzig,¹² Jeffrey L. Jorgensen,¹⁵ Wolfgang Kern,⁶ Marina Y. Konopleva,¹⁴ Francis Lacombe,¹⁶ Marta Libura,¹⁷ Agata Majchrzak,¹⁸ Luca Maurillo,⁴ Yishai Ofran,¹⁹ Jan Philippe,¹⁰ Adriana Plesa,²⁰ Claude Preudhomme,²¹ Farhad Ravandi,¹⁴ Christophe Roumier,²¹ Marion Subklewe,⁸ Felicitas Thol,¹ Arjan A. van de Loosdrecht,³ Bert A. van der Reijden,²² Adriano Venditti,⁴ Agnieszka Wierzbowska,²³ Peter J. M. Valk,²⁴ Brent L. Wood,²⁵ Roland B. Walter,²⁶ Christian Thiede,^{27,28} Konstanze Döhner,¹² Gail J. Roboz,¹³ and Jacqueline Cloos³

MRD par cytométrie en flux

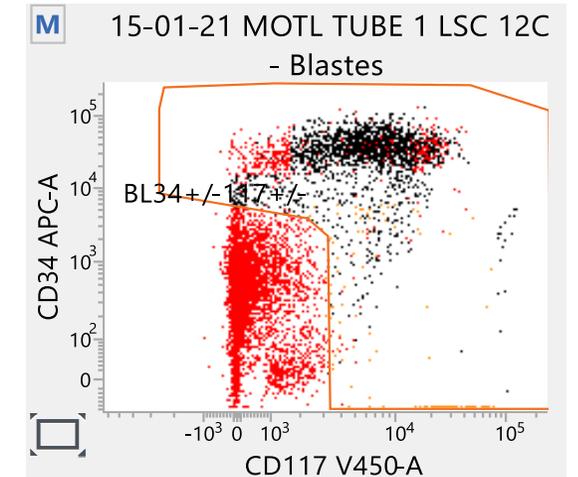
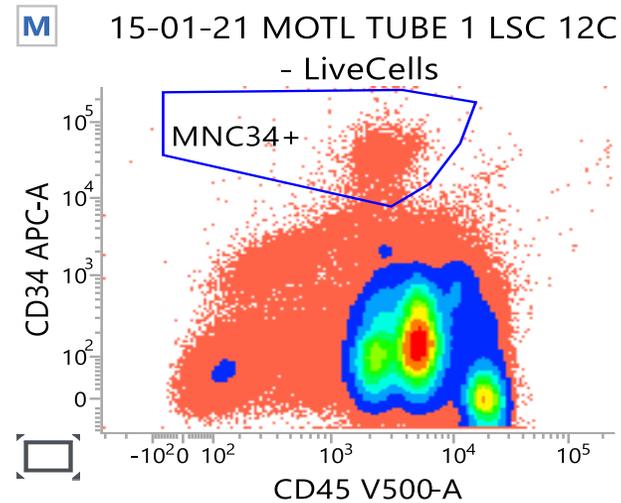
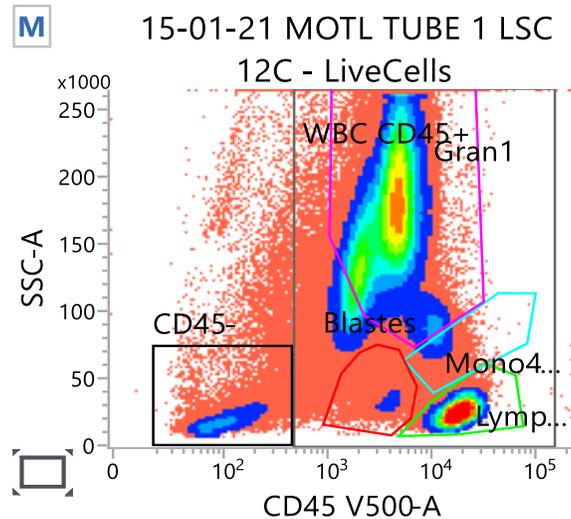
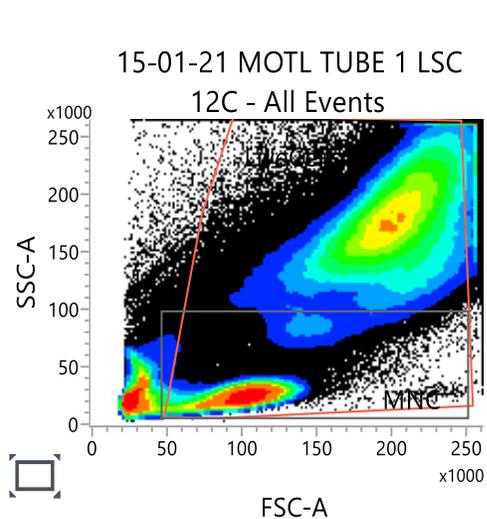
MRD dans les LAM par cytométrie en flux

- Frein jusqu'à récemment : complexe, hétérogénéité des populations myéloïdes physiologiques
- Groupes coopérateurs, standardisation, partage d'expérience (MRDflow)
- Recherche de marqueurs aberrants : phénotype caractéristique du clone leucémique
 - Marqueurs aberrants/infidélité de lignée (lymphoïde)
 - Asynchronisme de maturation
 - Hyper/hypoexpression

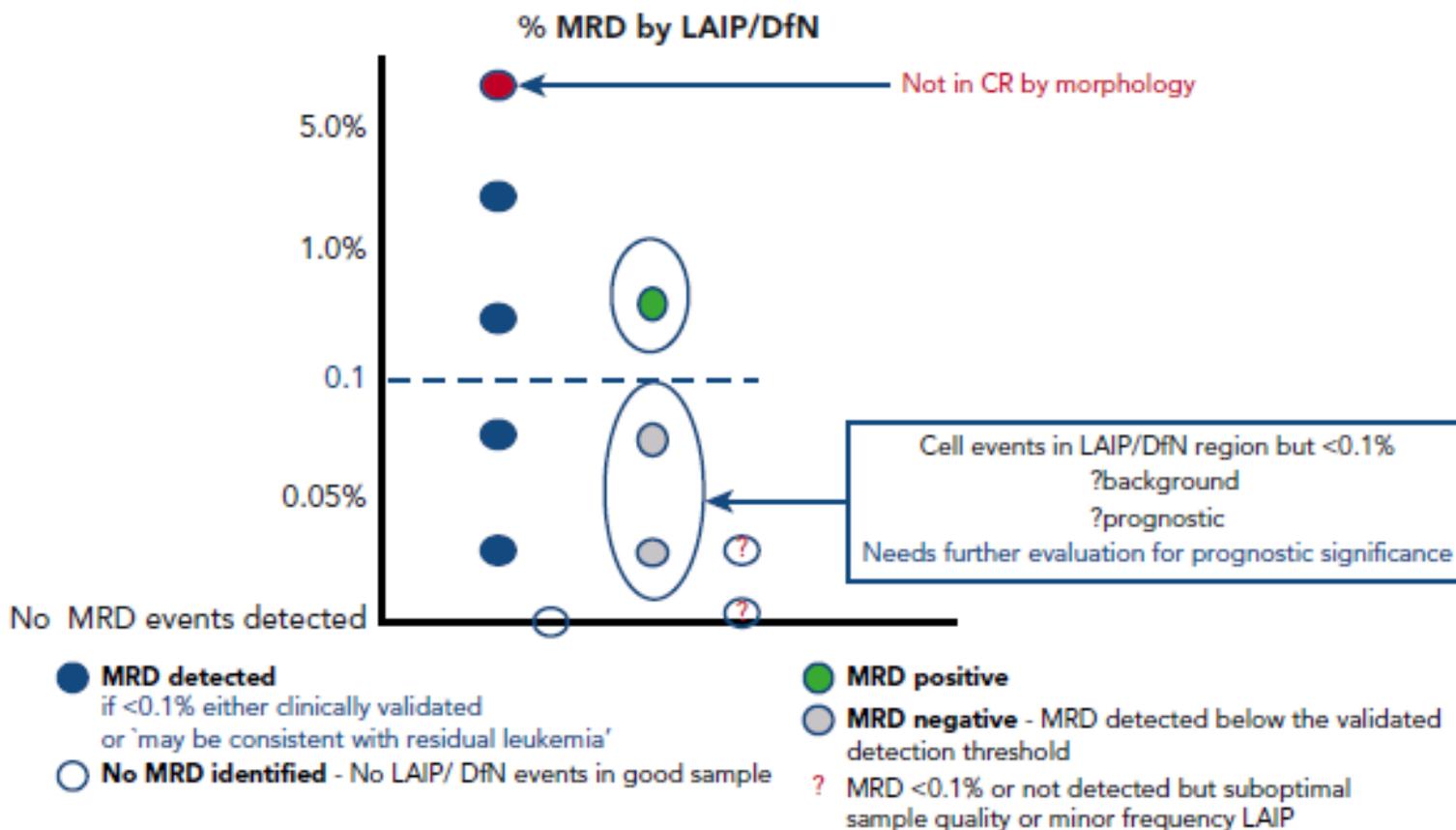
Zone blastes	Zone cellules souches leucémiques (CSL)
LAIP (<i>Leukemia Associated ImmunoPhenotype</i>) DfN (<i>Different from Normal</i>)	Stratégie LSC (<i>Leukemia Stem Cell</i>)

MRD CMF : stratégie LAIP/Dfn

- **Tube du diagnostic** pour fenêtrage +++
- **Evaluation de l'hémodilution** du prélèvement++
- **Acquisition: au moins 500 000 cellules** vivantes dont au moins 100 cellules vivantes dans la fenêtre blastes



MRD CMF : stratégie LAIP/Dfn



Schuurhuis et al., Blood, 2018

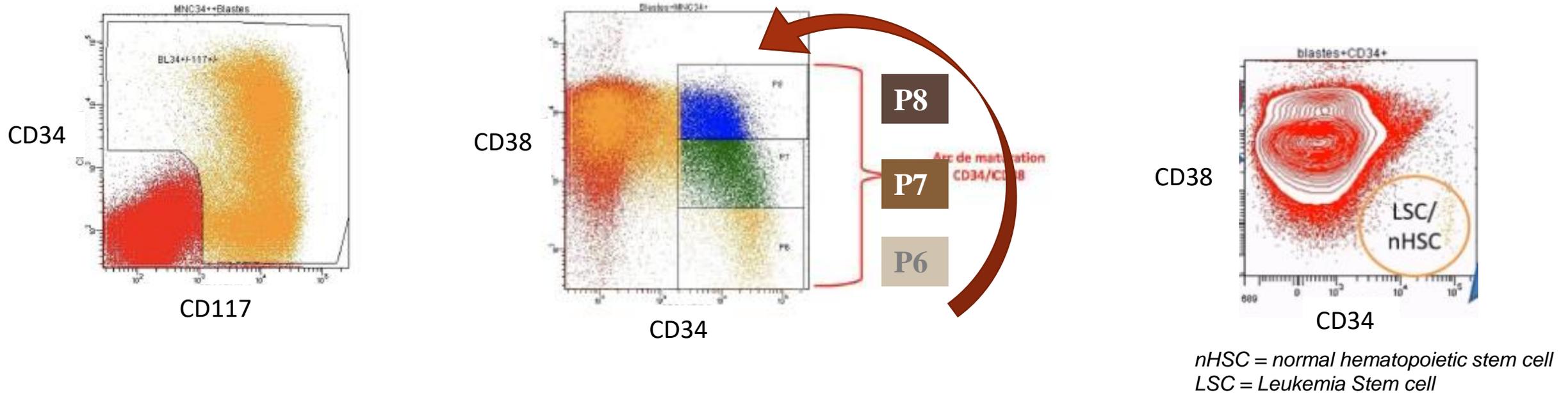
Diagnosis of AML	
Diagnosis of AML	
Precursor marker	CD34, CD117, HLA-DR
Myeloid markers	Cytoplasmic MPO, CD33, CD13
Myeloid maturation markers	CD11b, CD15, CD64, CD65
Monocytic markers	CD14, CD36, CD64, CD4, CD38, CD11c
Megakaryocytic markers	CD41 (glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (glycoprotein IIIa), CD36
Erythroid markers	CD235a (glycophorin A), CD71, CD36
Core MRD markers	CD34, CD117, CD45, CD33, CD13, CD56, CD7, HLA-DR If monocytic: CD64, CD11b, CD4 (in addition)

Döhner et al., Blood, ELN 2022

MFC-MRD test positivity is defined as >0.1% of CD45-expressing cells with the target immunophenotype.

Comparaison avec moelle normale ++
Attention aux phénotypes de régénération

MRD CMF : stratégie LSC



Différences avec les CSH : CSL : CD34⁺ CD38⁻ +marqueur aberrant : CD45RA, CD123, CLL1 etc...

Acquisition: au moins 4M d'évènements

MRD par biologie moléculaire

MRD dans les LAM par biologie moléculaire

- Mutations pré-leucémiques

- Épigénétique, épissage

- Anomalies liées à la transformations

- Blocage de différenciation
- Facteurs de transcription
- Mutuellement exclusives = sous-types

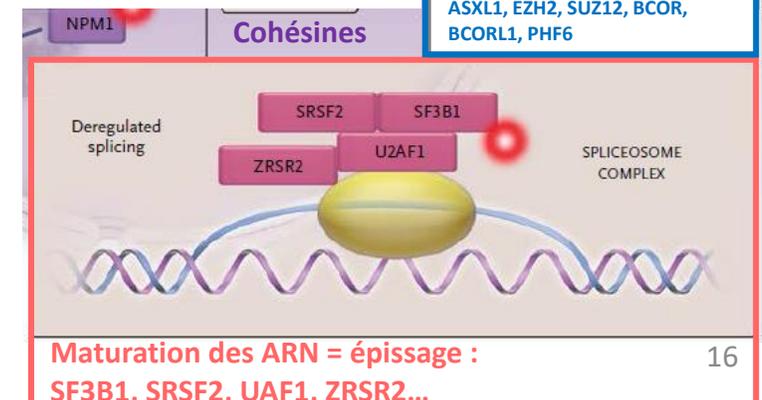
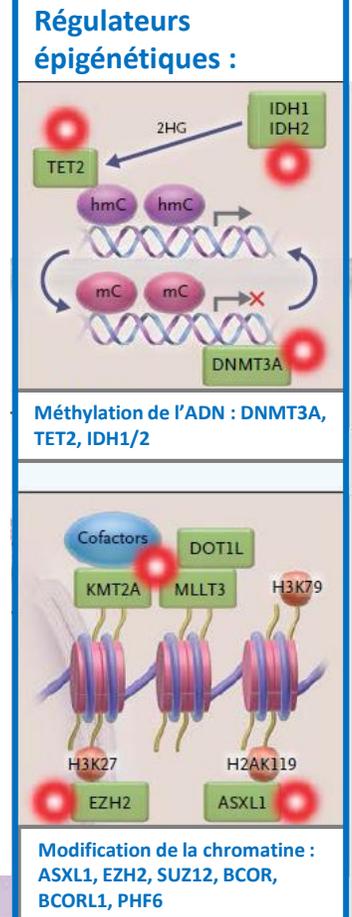
- Mutations de voies de signalisations

- Avantage prolifératif ou de survie
- Mutations gain de fonction ou fusions TK

- Mutations gènes suppresseurs de tumeurs

Principales catégories de gènes mutés dans les LAM

adapté de Döhner et al., 2015

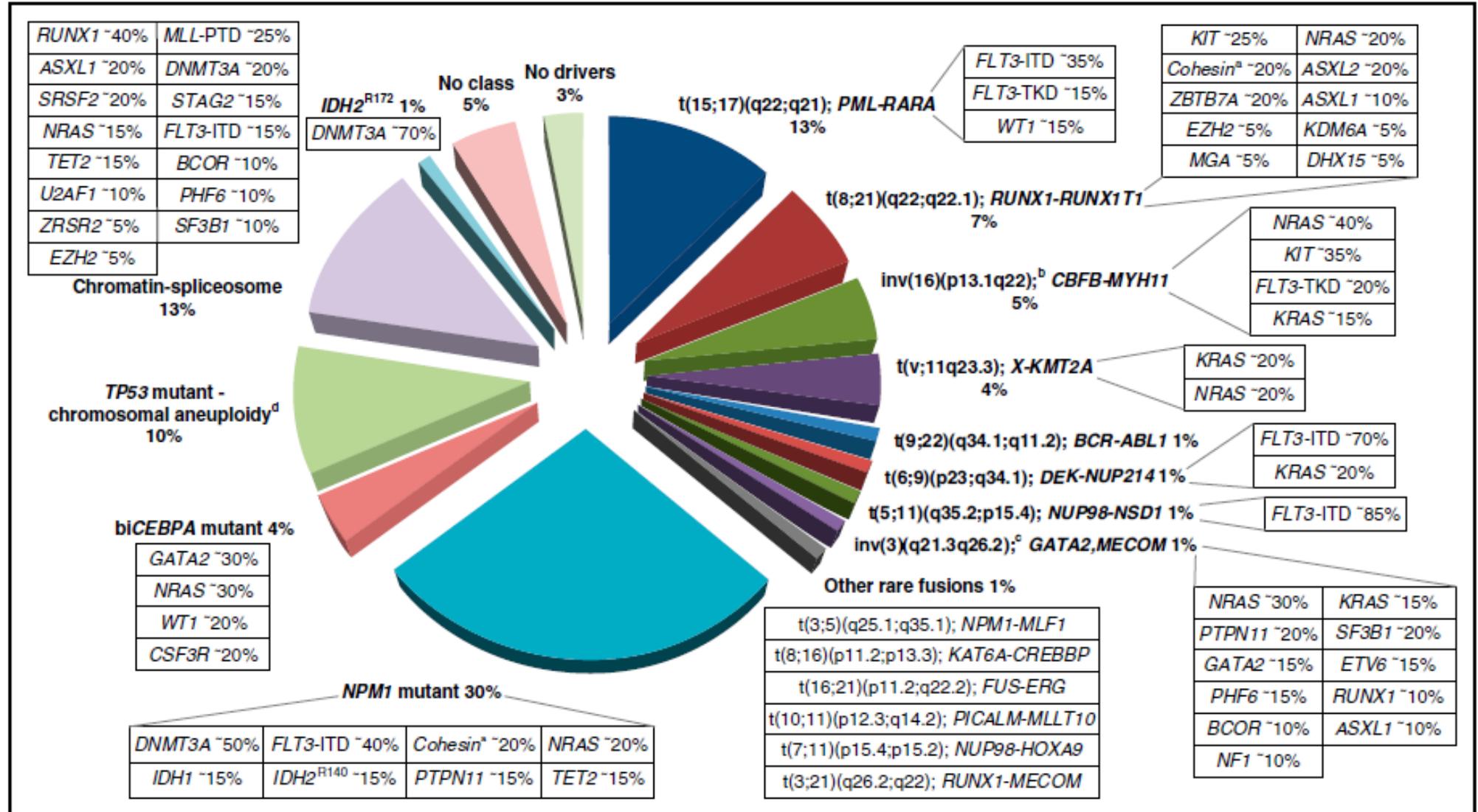


MRD dans les LAM par biologie moléculaire

Anomalies liées à la transformation = anomalies leucémiques = définissent une sous-entité

Sensibles

Spécifiques



MRD dans les LAM par biologie moléculaire

Quelle cible ?

Pré-leucémiques

DNMT3A +++
TET2
IDH1
IDH2
ASXL1

- Sensibles
- Potentiellement non spécifiques

Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP)

Steensma et al, Blood 2015

Leucémiques

Transcrits de fusion
NPM1 PML::RARA
CEBPA* RUNX1::RUNX1T1
RUNX1* CFBF::MYH11
...

- Sensibles
- Spécifiques

*** Si non germinales**

Leucémiques sous-clonales

FLT3-ITD
FLT3-TKD
RAS
PTPN11
KIT

- Spécifiques
- Perdus dans 10-90% des cas

Do not use mutations in FLT3-ITD, FLT3-TKD, NRAS, KRAS, DNMT3A, ASXL1, IDH1, IDH2, MLL-PTD ...as *single MRD markers*.

*However, these markers may be useful when used in **combination** with a second MRD marker.*

Schuurhuis et al, ELN Blood 2018

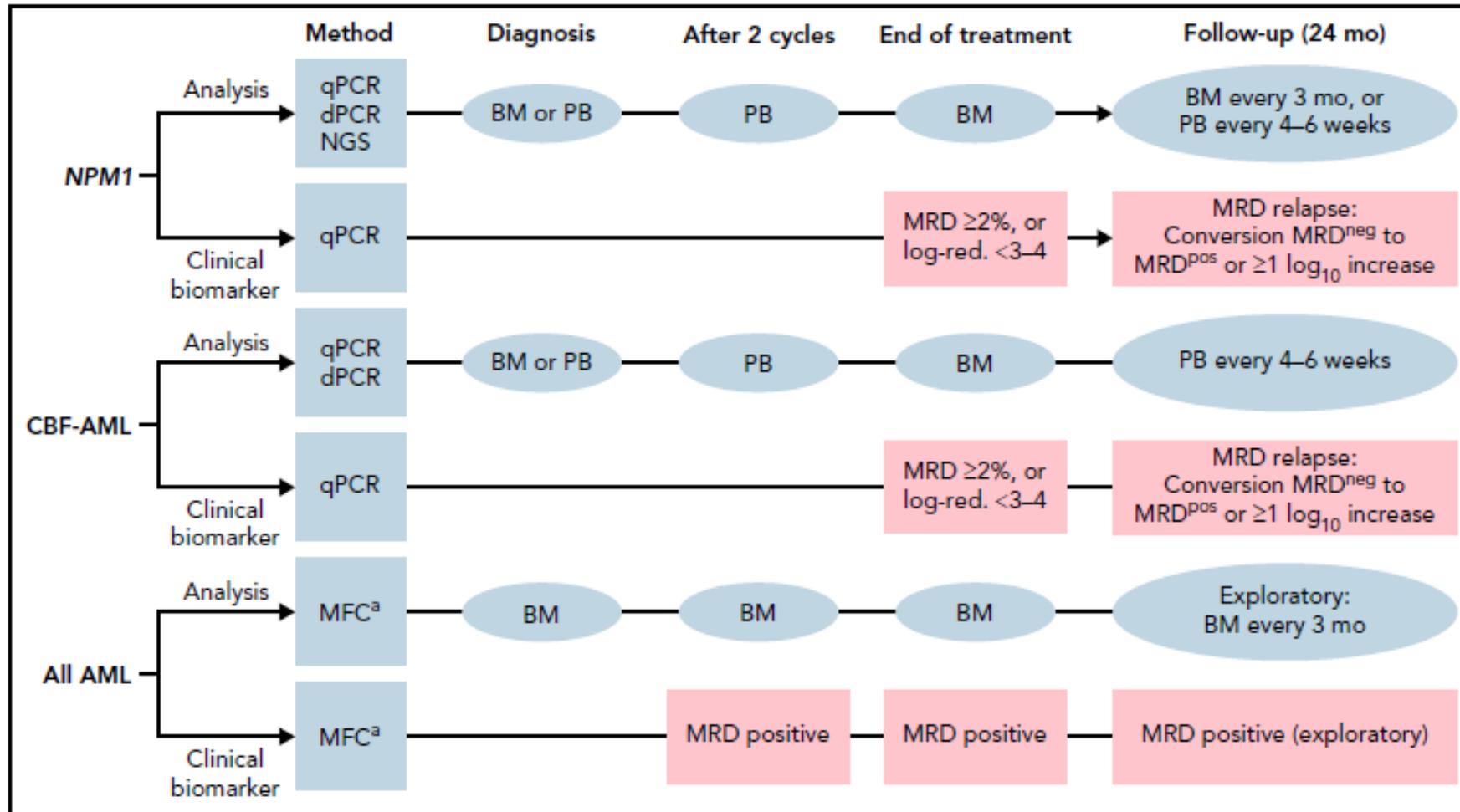


Figure 2. Algorithm of MRD assessment and time points at which MRD is considered a clinically relevant biomarker. Blue squares indicate timepoints of assessment and source of material; pink squares indicate timepoints for treatment modification based on a clinical relevant biomarker: for example, if the level of molecular MRD as assessed by qPCR is $\geq 2\%$ or if there is failure to reduce mutant transcript levels by 3 to 4 log after completion of consolidation chemotherapy, treatment modifications (eg, allogeneic hematopoietic cell transplantation) may be considered; similarly, if patients are still MRD positive by MFC after 2 cycles of intensive chemotherapy or at end of treatment. For patients receiving less intensive therapy, timepoints for assessment and clinical decision making are not yet established. Modified from 2021 ELN MRD recommendations⁶⁷ BM, bone marrow; CBF, core-binding factor. ^aMFC as assessed by LAIP or the DfN method.

MRD pour LAP

2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party

Michael Heuser,¹ Sylvie D. Freeman,² Gert J. Ossenkoppele,³ Francesco Buccisano,⁴ Christopher S. Hourigan,⁵ Lok Lam Ngai,³ Jesse M. Tettero,³ Costa Bachas,³ Constance Baer,⁶ Marie-Christine Béné,⁷ Veit Bücklein,⁸ Anna Czyz,⁹ Barbara Denys,¹⁰ Richard Dillon,¹¹ Michaela Feuring-Buske,¹² Monica L. Guzman,¹³ Torsten Haferlach,⁶ Lina Han,¹⁴ Julia K. Herzig,¹² Jeffrey L. Jorgensen,¹⁵ Wolfgang Kern,⁶ Marina Y. Konopleva,¹⁴ Francis Lacombe,¹⁶ Marta Libura,¹⁷ Agata Majchrzak,¹⁸ Luca Maurillo,⁴ Yishai Ofran,¹⁹ Jan Philippe,¹⁰ Adriana Plesa,²⁰ Claude Preudhomme,²¹ Farhad Ravandi,¹⁴ Christophe Roumier,²¹ Marion Subklewe,⁸ Felicitas Thol,¹ Arjan A. van de Loosdrecht,³ Bert A. van der Reijden,²² Adriano Venditti,⁴ Agnieszka Wierzbowska,²³ Peter J. M. Valk,²⁴ Brent L. Wood,²⁵ Roland B. Walter,²⁶ Christian Thiede,^{27,28} Konstanze Döhner,¹² Gail J. Roboz,¹³ and Jacqueline Cloos³

- **PML::RARA :**

- the most important : negativity at the end of consolidation.
- non–high-risk APL : discontinued once BM MRD negativity is achieved.
- high-risk APL MRD : from BM every 3 mo for 24 months starting at the end of treatment. Alternatively, MRD may be assessed from PB every 4 to 6 wk during follow-up.

MRD LAM NPM1+

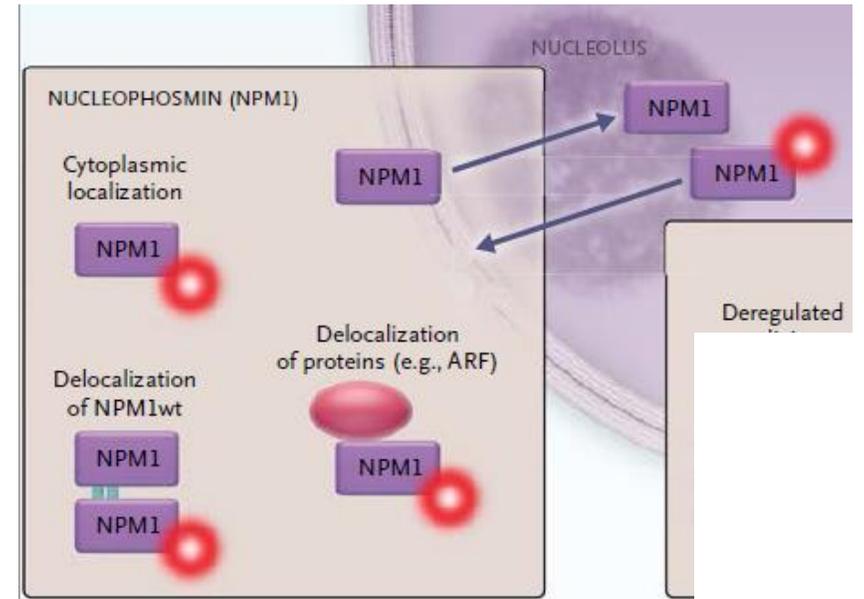
- MRD NPM1+ :

- MRD-LL = 2% => very low relapse risk when measured at the end of consolidation chemotherapy => prolonged survival

- Variants A/D/B : qPCR

- Variants rares non A/D/B : ddPCR/qPCR à façon

Lesieur et al., Haematologica, 2021



MRD dans les LAM : autres marqueurs

Molecular biology

- 1 Molecular MRD analysis is indifferent to the anticoagulant used during cell sampling, and thus both heparin and EDTA can be used as anticoagulant.
- 2 Aspirate 5-10 mL of BM, and use the first pull for molecular MRD assessment.
- 3 WT1 expression should not be used as MRD marker, unless no other MRD marker is available in the patient.
- 4 Do not use mutations in FLT3-ITD, FLT3-TKD, NRAS, KRAS, DNMT3A, ASXL1, IDH1, IDH2, MLL-PTD and expression levels of EVI1 as single MRD markers. However, these markers may be useful when used in combination with a second MRD marker.
- 5 We define molecular progression in patients with molecular persistence as an increase of MRD copy numbers $\geq 1 \log_{10}$ between any 2 positive samples. Absolute copy numbers should be reported in addition to the fold increase to enable the clinician to make his/her own judgments.
- 6 We define molecular relapse as an increase of the MRD level of $\geq 1 \log_{10}$ between 2 positive samples in a patient who was previously tested negative.
The conversion of negative to positive MRD in PB or BM should be confirmed 4 wk after the initial sample collection in a second sample from both BM and PB. If MRD increases in the follow-up samples $\geq 1 \log_{10}$, molecular relapse should be diagnosed.

MRD dans les LAM : et WT1 ?

- qRT-PCR hyperexpression de WT1 (et EVI1) :
 - Les progéniteurs physiologiques surexpriment aussi WT1
 - seuil >0,5%(sang), 2,5% (moelle)
 - N'est pas spécifique de la leucémie !
 - Préférer les marqueurs plus spécifiques
 - transcrits de fusion, NPM1
- WT1, on oublie ?
 - Intérêt de la réponse précoce (après induction)
 - MRDhigh = higher risk of relapse, shorter RFS and OS

Lambert et al., Bld Adv, 2021

REGULAR ARTICLE

 blood advances

Early detection of *WT1* measurable residual disease identifies high-risk patients, independent of transplantation in AML

Juliette Lambert,¹ Jerome Lambert,² Xavier Thomas,³ Alice Marceau-Renaut,⁴ Jean-Baptiste Micol,⁵ Aline Renneville,⁴ Emmanuelle Clappier,⁶ Sandrine Hayette,³ Christian Récher,⁷ Emmanuel Raffoux,⁸ Arnaud Pigneux,⁹ Celine Berthon,¹⁰ Christine Terré,¹¹ Karine Celli-Lebras,¹² Sylvie Castaigne,¹ Nicolas Boissel,⁸ Philippe Rousselot,¹ Claude Preudhomme,⁴ Hervé Dombret,⁸ and Nicolas Duployez⁴

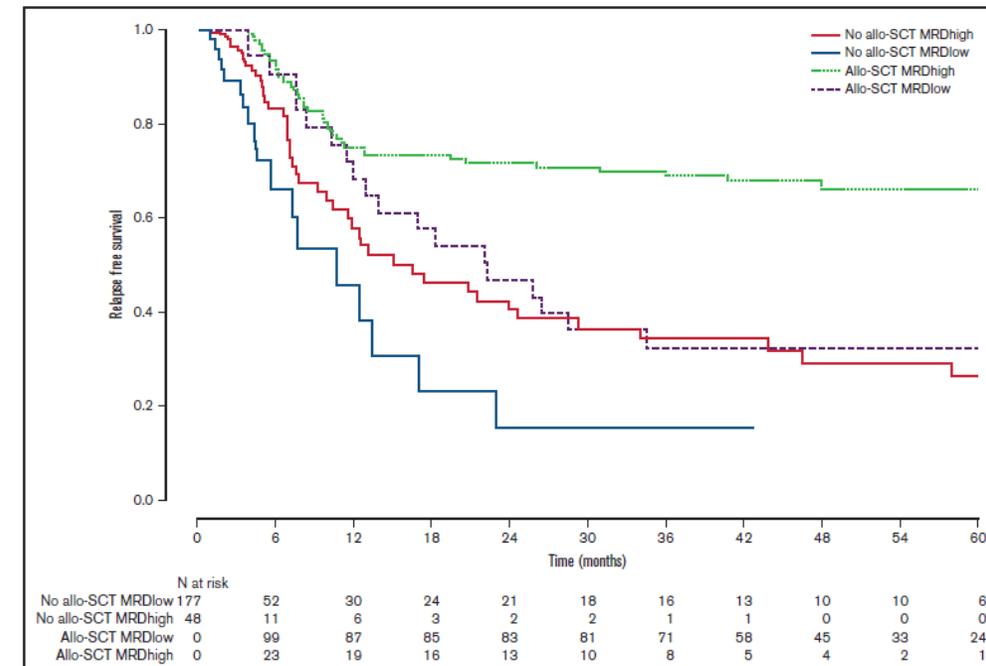


Figure 4. Simon-Makuch plots for RFS according to *WT1* MRD and postremission therapy (allo-SCT or no allo-SCT) in patients with intermediate-/unfavorable-risk AML. MRD^{high}, patients with *WT1*/100ABL >2.5% in BM or >0.5% in PB. MRD^{low}, patients with *WT1*/100ABL <2.5% in BM or <0.5% in PB.

Le suivi de maladie résiduelle : Place de chaque technique

- **Concurrence CMF et BM ?**
 - 2 techniques parallèles
 - MRD +/+, MRD+/-, MRD-/-

Transcrits de fusion	Cytométrie en flux
Sensibilité : 10 ⁻⁴ à 10 ⁻⁶	Sensibilité : 10 ⁻³ à 10 ⁻⁴
Sang ou moelle	Moelle
Standardisé	Standardisation du backbone nécessaire, nouveaux marqueurs, nouveaux cytomètres
Coût+++	Rapide pour la technique+++ (mais interprétation)
ARN : quantité non reliée au nombre de cellules	Nombre de cellules directement
Spécifique du type de leucémie	Moins spécifique
Cible très stable si transcrit de fusion/NPM1	Cible de stabilité variable : combinaison Dfn et LSC

Table 7. Methods for detection of MRD in AML

	Method	Target	Sensitivity	Applicable in % of AML	Turn-around time (days)	Limitations/problems
Established	Multi-parameter flow cytometry (MFC)	Leukemia-associated immunophenotype (LAIP) or different from normal (DfN)	10^{-3} to 10^{-4}	85-90	2	Less sensitive, more subjective analysis
Established	Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)	Robust data: <i>NPM1</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> Less validated: <i>KMT2A::MLLT3</i> , <i>DEK::NUP214</i> , <i>BCR::ABL1</i> , <i>WT1</i>	10^{-4} to 10^{-5}	40-50*	3-5	Limited applicability
Exploratory	Next-generation sequencing (NGS)†,‡	Potentially any somatic mutation†	10^{-2} to 10^{-4}	~100	5-10	Less sensitive, costly, technically challenging
Exploratory	Digital PCR (dPCR)	Specific targeted mutations	10^{-3} to 10^{-4}	~70	3-5	Specific assay necessary for every mutation, limited sensitivity

*Less frequent in elderly patients with AML.

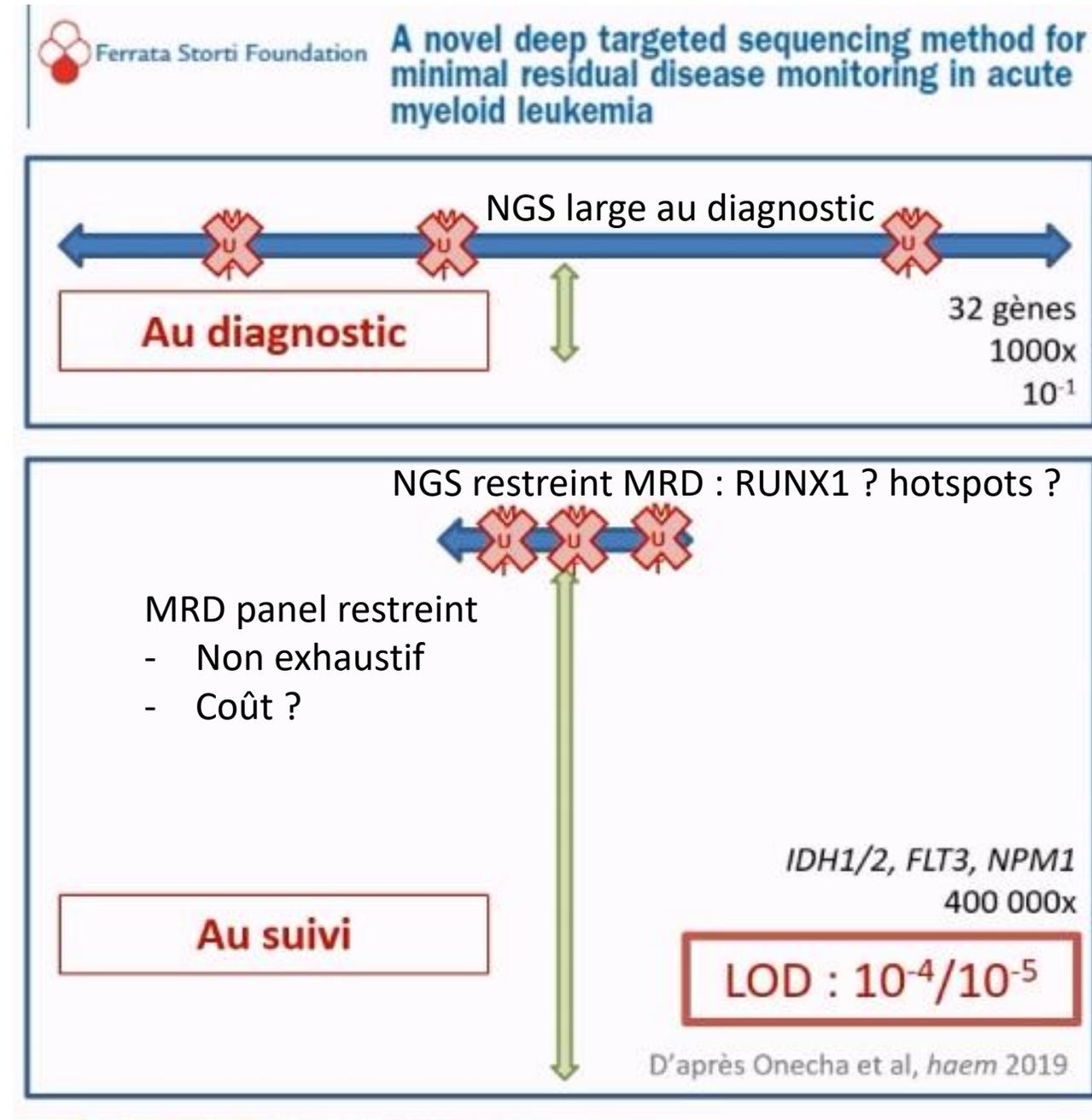
†The NGS-MRD threshold has not been defined for individual mutations; NGS-MRD positivity is provisionally defined as $\geq 0.1\%$ variant allele frequency, excluding mutations related to clonal hematopoiesis and germline mutations.

‡Common gene mutations consistent with pre-malignant clonal hematopoiesis such as *DNMT3A*, *TET2*, and *AXSL1* excluded; further study is required to determine which mutations are truly indicative of residual AML and not clonal hematopoiesis.

MRD dans les LAM : NGS ?

- Fréquence allélique des gènes :
 - sensibilité : 0,1% (seuil fixé par les recommandations)
 - si UMI et Profondeur augmentée => panel réduit ?
- Recommandations
 - toute mutation doit être considérée comme candidat de suivi pour MRD
 - SAUF : mutations germinales (VAF ~ 50% des gènes ANKRD26, CEBPA, DDX41, ETV6, GATA2, RUNX1, TP53), mutations associées au CHIP: DNMT3A, TET2, ASXL1

Onecha et al., Haematologica, 2021



MRD dans les LAM : chimérisme ??

Chimérisme post-allogreffe : outils de suivi de reconstitution hématopoïétique et immunitaire

- sur moelle
- sur cellules CD34⁺
- si suspicion de rechute uniquement, car sensibilité insuffisante++

Pour finir sur la MRD

- MRD relapse :

- 1. Conversion of MRD negativity to MRD positivity independent of the MRD technique, or
- 2. increase in MRD copy numbers $>1 \log_{10}$ between any 2 positive samples in patients with CR-MRD-LL who are monitored by qPCR.
- **3. The result of (1) or (2) should be rapidly confirmed in a second consecutive sample, preferably from the BM (to be confirmed within 4 wk)**

- Risk relapse :

- MRD -/- < MRD +/- < MRD +/+