

Maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes : aspects biologiques

Claude Preudhomme, Laboratoire hématologie, CHU Lille, France
Adriana Plesa, Laboratoire hématologie CHU-HCL Lyon, France
Christophe Roumier, Laboratoire hématologie, CHU Lille, France

Tirés à part : C. Preudhomme
 Claude.preudhomme@chru-lille.fr

Remerciements : Aux cytométristes de l'Intergroupe français ALFA-MRD-LAM-LSC pour tous leurs efforts dans la mise en place et l'harmonisation de ce protocole dans 30 centres du protocole BIG (ALFA et FILO), en particulier au Dr Florent Dumezy pour le développement du ScriptR apte à générer des fichiers FCS intégrant en plus des données initiales les données d'analyses non supervisée visualisable sur KALUZA analysis software.

Aux patients et participants des groupes ALFA et ELAMO2, pour avoir accepté de soutenir cette thématique depuis de nombreuses années

Aux membres MRD de L'ELN (particulièrement au Pr Sylvie Freeman [Birmingham, GB] pour notre étroite collaboration et toutes les discussions fructueuses autour de la MRD flow).

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

Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: biological features

Leucémie aiguë myéloïde, maladie résiduelle, cytométrie en flux, biologie moléculaire
Acute myeloid leukemia, minimal residual disease, flow cytometry, molecular biology

Résumé

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent une entité très hétérogène dont le pronostic reste sombre malgré des progrès considérables réalisés ces dernières années, procédant d'une meilleure compréhension de la physiopathologie ainsi que d'avancées technologiques dans les champs de la biologie moléculaire et de la cytométrie de

Abstract

Acute myeloid leukaemia (AML) is a very heterogeneous entity whose prognosis remains poor despite considerable progress in recent years, partly due to the better understanding of pathophysiology and also to technological advances in both molecular biology and flow cytometry. Minimal Residual disease (MRD) theoretically provides a global

Pour citer cet article : Preudhomme C, Plesa A, Roumier C. Maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes : aspects biologiques. *Hématologie* 2020 ; 26(supplément 1) : 5-18. doi : 10.1684/hma.2020.1521

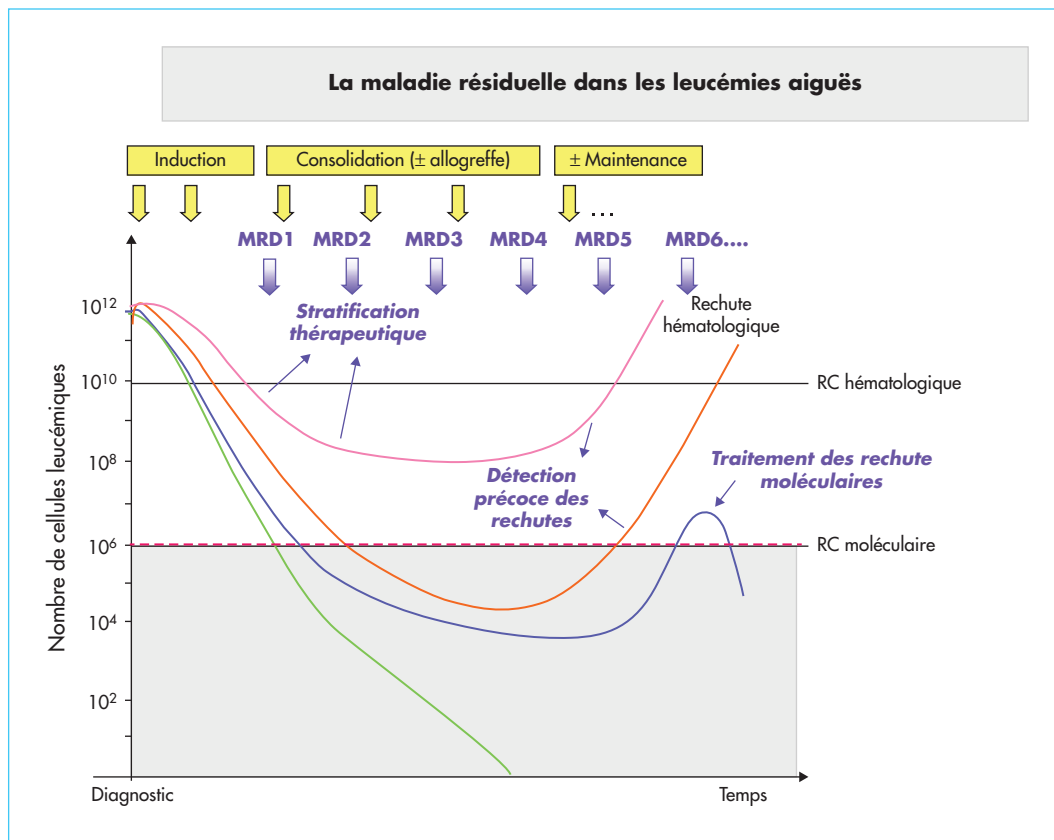


flux. La maladie résiduelle (MRD) permet, sur le plan théorique, d'avoir en un seul test une vision globale de la réponse au traitement. Si elle est l'un des paramètres clés dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, son utilisation pour une stratification personnalisée dans les LAM reste limitée à quelques sous-groupes comme les leucémies aiguës promyélocyaires, à *core binding factor* ou à *NPM1* muté. Les causes principales en sont, d'une part, la sensibilité insuffisante des techniques utilisées pour les autres sous-groupes moléculaires, et d'autre part l'absence d'homogénéisation tant des techniques employées que du matériel utilisé (sang *versus* moelle osseuse) et du moment où les analyses sont réalisées dans les études protocolaires rétrospectives. Ce sont ces derniers paramètres qu'il sera nécessaire de standardiser rapidement avant de faire de la MRD un *surrogate marker* dans les LAM.

view of the response to treatment in a single test. Although it is one of the key parameters in acute lymphoblastic leukaemias, its use for personalized stratification in AMLs remains limited to a few subgroups such as core binding factor, NPM 1 mutated or acute promyelocytic leukaemias. This is mainly due to a lack of sensitivity of the techniques used for the other molecular subgroups, the lack of homogenization of the techniques, and the heterogeneity of the biological material used (blood versus bone marrow). It is these latter parameters that will need to be quickly standardized before the MRD can be used as a surrogate marker in AMLs.

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent probablement l'un des sous-groupes d'hémopathies malignes le plus hétérogènes, que ce soit sur le plan morphologique, phénotypique ou génotypique. L'identification de nombreux marqueurs au diagnostic – incluant la cytogénétique, l'âge, la leucocytose et les marqueurs moléculaires – ont permis une meilleure stratification et une amélioration de la survie. Toutefois, celle-ci demeure médiocre, en

FIGURE 1



Cinétique de la MRD dans les LAM au cours des différentes phases du traitement.

particulier chez le sujet âgé [1, 2]. L'utilisation de tests post-thérapeutiques permettant d'évaluer globalement la réponse ou la persistance de maladie résiduelle (MRD) devrait permettre d'améliorer encore cette stratification et la prise en charge thérapeutique des patients [3].

Qu'est-ce que la maladie résiduelle ?

C'est la persistance d'un petit nombre de cellules leucémiques résiduelles indétectables par les techniques morphologiques (numération-formule sanguine ou myélogramme), résistantes à la chimiothérapie, et qui sont le plus souvent responsables de la rechute.

La MRD est un processus dynamique : la cinétique de réduction de la MRD au cours du traitement est le reflet de la chimiosensibilité des cellules tumorales. La MRD intègre donc les facteurs pronostiques préthérapeutiques et la réponse de l'hôte (immunité antitumorale). Ainsi constitue-t-elle un facteur pronostique puissant et souvent indépendant des facteurs préthérapeutiques.

Au diagnostic d'une leucémie, l'organisme est envahi par 10^{11} ou 10^{12} cellules tumorales. Le but du traitement d'induction est d'obtenir la rémission complète hématologique (RCH) avec, dans le cas des LAM, normalisation de l'hémogramme et moins de 5 % de blastes dans la moelle, c'est-à-dire une réduction d'environ un à deux \log_{10} (facteur 10 à 100) (figure 1)

Mais, même lorsque la RCH a été obtenue, la charge tumorale peut encore être très importante : théoriquement entre 0 et 10^9 cellules tumorales [4].

Le but des traitements de consolidation est donc, idéalement, d'éradiquer totalement la masse tumorale pour aboutir à une guérison de la LAM. Dans le cas contraire, les cellules tumorales résiduelles pourront être à l'origine d'une rechute plus ou moins précoce selon la profondeur de la réponse et de l'immunité antitumorale de l'hôte.

Il est important de noter que les techniques disponibles aujourd'hui, même les plus sensibles, ne permettent pas de descendre en dessous d'une sensibilité de 10^{-6} . La zone grise représentée ici est donc inaccessible aux explorations, et la RC moléculaire (MRD indétectable) ne signifie pas une absence de persistance de la maladie.

Pourquoi étudier la maladie résiduelle ?

Pour établir de manière reproductible, objective et sensible le statut de rémission.

- Comme marqueur pronostique de chimiosensibilité, pour améliorer la stratification thérapeutique en combinaison avec les autres marqueurs pronostiques.
- Pour réaliser le suivi pendant le traitement et identifier le plus tôt possible une rechute éventuelle.
- Pour avoir un marqueur continu de réponse lors de la comparaison de différentes stratégies thérapeutiques ou de nouvelles drogues (*surrogate marker*).

Quels sont les critères de choix du ou des marqueurs [5] ?

Les critères majeurs sont :

- un marqueur avec la plus grande sensibilité possible,
- un marqueur spécifique de la maladie,
- un marqueur stable entre le diagnostic et la rechute,
- un marqueur applicable à un grand nombre de patients,
- une technique facilement réalisable en routine hospitalière,
- une technique ayant un coût acceptable.



En tenant compte de ces critères, les meilleurs marqueurs de MRD dans les LAM sont :

- les transcrits de fusion et les mutations de *NPM1*, qui représentent 40 à 70 % des patients en fonction de l'âge,
- les marqueurs aberrants (LAIP, pour *leukemia aberrant immunophenotype*) ou de cellules souches leucémiques (CSL) quantifiés par cytométrie en flux,
- la quantification de WT1 et de certaines mutations.

Dans les leucémies aiguës myéloïdes, quelles techniques utiliser pour les marqueurs moléculaires ?

Le *gold standard* est actuellement représenté par la PCR quantitative inverse (rqPCR) qui est recommandée en priorité sur les transcrits de fusion : RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, PML-RARA [6, 7], WT1 [8] et NPM1 [9]. En fonction du transcrit, la sensibilité est comprise entre 10^{-4} et 10^{-6} . Il est toutefois important de noter que, contrairement à la leucémie myéloïde chronique, il n'y a pas de consensus international, ni même national, sur la meilleure façon d'exprimer les résultats : log de la réduction par rapport au diagnostic ? Par rapport à une échelle internationale (comme pour la LMC) ? Positivité par rapport à un seuil ?

Concernant WT1, la sensibilité est beaucoup plus faible, non pas du fait de la technique, mais du bruit de fond dû à l'expression de *WT1* dans les cellules souches hématopoïétiques normales. Ces dernières étant moins nombreuses dans le sang périphérique que dans la moelle osseuse, la sensibilité sur le sang est paradoxalement meilleure sur le sang que sur la moelle du fait d'un bruit de fond inférieur. Néanmoins, pour toutes ces raisons de manque de spécificité et de sensibilité, l'European Leukemia Net (ELN) a récemment recommandé de n'utiliser ce marqueur qu'en l'absence d'autres marqueurs moléculaires ou absence de marqueurs pouvant être suivi en cytométrie en flux (CMF). Ce point est discuté dans l'article de ce numéro dédié aux applications cliniques.

Pour les transcrits de fusion impliquant le gène *MLL/HRX*, comme dans les LAL, la rqPCR est également recommandée mais sur ADN après identification de la jonction des deux gènes partenaires [10]. Enfin, pour les autres transcrits de fusion, la rqPCR n'est pas standardisée et il existe peu de plasmides commerciaux permettant la calibration. Une quantification par PCR digitale (ddPCR) pourrait être une option intéressante. La rareté de ces derniers et la difficulté technique pour *MLL* nécessiterait une centralisation nationale de ces cas.

Concernant le suivi des patients avec mutations *NPM1*, le groupe MRD piloté par Grimwade a participé à la création et à la validation des plasmides correspondant aux mutations de type A, B et D commercialisés par la société Ipsogen. Toutefois, à ce jour, comme pour les transcrits de fusion, il n'existe aucune recommandation internationale sur l'expression des résultats. Afin de standardiser les résultats, deux nouveaux groupes de travail viennent d'être initiés, l'un au sein de l'ELN-MRD-AML (international) et le second au sein du Groupe des biologistes moléculaires des hémopathies malignes (GBMHM) (national).

Même si les mutations A, B et D de *NPM1* représentent environ 90 % des mutations de ce gène, le suivi des autres mutations pose problème non seulement sur le plan technique, mais également sur le plan thérapeutique (comme dans le protocole national BIG1) du fait de l'absence de résultat disponible. Sur le plan technique, la rqPCR semble peu adaptée du fait de l'absence de calibrant validé. La ddPCR semble être une bonne solution. En effet, elle ne nécessite pas de calibrant, sa mise en place est facile et son coût peu élevé. En France, Lesieur *et al.* ont validé cette approche sur la mutation *NPM1A* dans un premier temps et, dans un second temps, étendu son application aux mutations rares de *NPM1*. Les prélèvements de

40 patients ayant 18 différentes mutations rares de *NPM1* ont pu être ainsi suivis au CHU de Lille, avec des résultats très intéressants [11].

En cas d'absence de transcrits de fusion ou de mutation de *NPM1*, un suivi des mutations est possible soit par ddPCR, soit par séquençage de nouvelle génération (NGS). Pour des raisons pratiques, la ddPCR est essentiellement envisageable sur les hot-spots tels que les mutations des gènes *IDH1/IDH2*, *DNMT3-R882*, *N/KRAS*, *KIT* et *FLT3-TKD*. La sensibilité de cette technique est comprise entre 10^{-3} et 10^{-4} en fonction du marqueur et de la technologie utilisée [12]

La seconde approche est le NGS, qui, sur le plan théorique, devrait être plus sensible que la ddPCR. Toutefois, son efficacité sera fonction de la quantité d'ADN de la prise d'essai, de la qualité des séquences obtenues et du bruit de fond (recommandation d'utiliser des code-barres moléculaires). Son utilisation est aujourd'hui peu développée en raison des difficultés techniques et bio-informatiques, et surtout de son coût, très élevé pour des analyses prospectives. De manière générale, les mutations touchant la signalisation (*FLT3-ITD* et *-TKD*, *N/K-RAS*, *KIT*) ne sont pas recommandées comme marqueurs, car elles sont instables entre le diagnostic et la rechute. Il en va de même pour les mutations liées à l'âge, en particulier *DNMT3A*, qui persiste à des taux élevés chez la grande majorité des patients. Les autres marqueurs liés à l'âge, tels que *TET2*, *ASXL1*, et *IDH1/2*, doivent si possible être quantifiés avec d'autres marqueurs [13, 14]. Même si la technologie reste encore peu utilisée, son implémentation progressive dans les laboratoires d'hématologie devrait s'imposer d'ici quelques années (trois à cinq ans) avec deux stratégies différentes :

- soit une stratégie amplicon ciblé, qui a l'avantage d'être relativement peu onéreuse du fait de la taille limitée des bibliothèques, mais qui nécessite un design quasi spécifique pour chaque patient en dehors des hot-spots et qui ne permet de suivre que les mutations détectées au moment du diagnostic,
- soit une approche plus généraliste, permettant de détecter les mutations identifiées au diagnostic mais également les néomutations pouvant apparaître, par exemple en cas de résistance aux inhibiteurs de *FLT3*, *IDH1/IDH2*. Comme précédemment, il est possible d'utiliser une approche amplicon, mais les approches par capture devraient être privilégiées du fait d'une meilleure homogénéisation de couverture et du nombre limité de cycle de PCR à réaliser.

Une standardisation des techniques est en cours au sein du groupe ELN-MRD-AML. D'une manière générale, les techniques réalisées sur la moelle présentent une meilleure sensibilité que celles sur le sang. Une meilleure corrélation avec l'évolution clinique (rechute) a néanmoins été récemment publiée, notamment sur le suivi de *NPM1* et de *RUNX1-RUNX1T1* en fin de traitement et également de *WT1* [8, 15-17].

Quelles sont les exigences techniques pour l'évaluation de la maladie résiduelle par techniques de biologie moléculaire ?

Pour la qPCR, l'ELN [20] recommande l'utilisation de l'ADNc plutôt que de l'ADN, spécialement pour les transcrits de fusion et les mutations de *NPM1*. Chaque analyse doit être effectuée en triple exemplaire. Si deux des trois répliquats ont une valeur de $Ct \leq 40$, l'échantillon est considéré comme positif selon les recommandations de l'EAC. Au cours de chaque run, quatre contrôles doivent être inclus : un contrôle négatif, deux contrôles positifs couvrant la gamme de sensibilité souhaitée et une eau témoin.

La conversion d'un résultat négatif en un résultat positif doit être confirmée quatre semaines plus tard sur un deuxième échantillon. Si l'augmentation de la MRD dans le deuxième échantillon est supérieure à un \log_{10} , le diagnostic de rechute moléculaire est confirmé.



Dans les leucémies aiguës myéloïdes, quelle approche méthodologique utiliser en cytométrie en flux ?

L'étude de la MRD en CMF repose sur la caractérisation des aberrations d'expression de protéines le plus souvent membranaires à la surface des cellules blastiques permettant de différencier ces cellules de celles de l'hématopoïèse normale (LAIP). Ces aberrations d'expression sont de trois ordres :

- expression de marqueurs d'une autre lignée que la lignée myéloïde,
- modulation de l'intensité d'expression de marqueurs de la lignée myéloïde (absence, diminution ou même surexpression),
- asynchronisme d'expression.

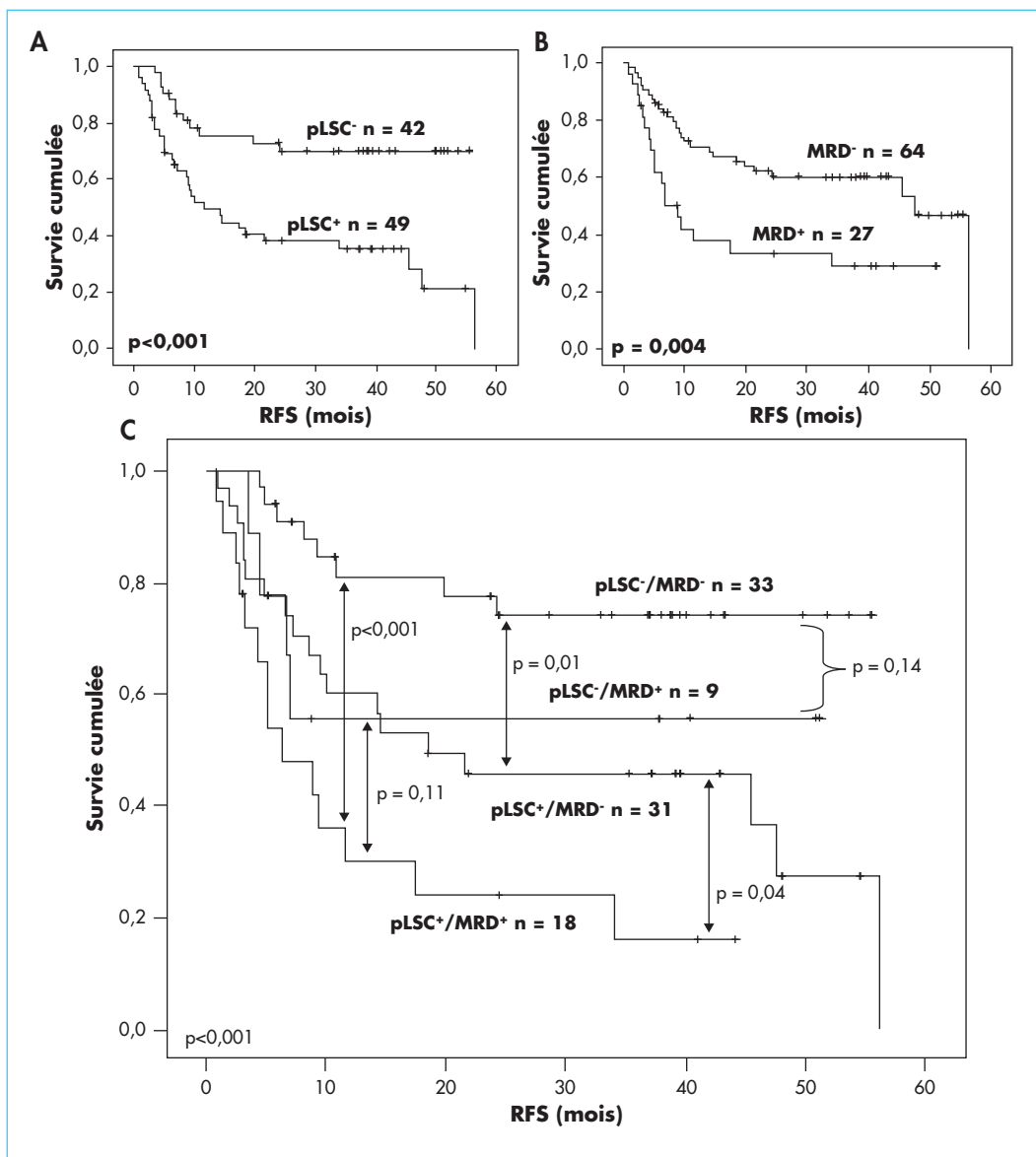
Lors de la maturation hématopoïétique depuis les progéniteurs jusqu'aux éléments terminaux de lignée, une succession de marqueurs membranaires accompagne chaque étape de la différenciation, ceci dans un ordonnancement très rigoureux. Cet ordre est en revanche souvent perturbé lors du processus leucémique et il est fréquent que les blastes expriment à leur surface une mosaïque de marqueurs ne devant pas être exprimés au même stade de différenciation. Ces anomalies sont mises en évidence en CMF grâce à deux stratégies d'analyse :

- soit le suivi des LAIP identifiés au diagnostic,
- soit la stratégie dite DfN (pour *different from normal cells*) qui repose sur la mise en évidence de cellules présentant des caractéristiques les différenciant de l'hématopoïèse normale – cette deuxième approche ne nécessitant pas de connaître l'immunophénotype au diagnostic.

Cette technique peut également détecter l'apparition de nouveaux marqueurs sur les blastes au cours de la maladie et de son traitement (*shift* d'immunophénotype). La différence entre les deux approches est tout à fait minime puisque, dans les deux cas, une parfaite connaissance des caractéristiques immunologiques de chaque type cellulaire observable dans la moelle osseuse à chaque stade de la différenciation hématopoïétique est le préalable à toute étude de MRD en CMF. L'évolution des cytomètres de flux permet actuellement de suivre, en routine de laboratoire, de huit à 14 marqueurs ayant des fluorescences différentes. Ces approches autorisent l'utilisation de larges panels d'anticorps de plus en plus aptes à différencier les cellules leucémiques des cellules hématopoïétiques normales à tous leurs stades de maturation (voir recommandations ELN) [18]. Enfin, l'apparition de l'immunothérapie – que ce soit via des anticorps monoclonaux et/ou des cellules T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T) – implique de considérer comme cruciale la question des *shifts* phénotypiques sous la pression de l'immunothérapie avant d'envisager une combinaison LAIP comme pertinente. De même, dans le cadre de l'utilisation de thérapeutique induisant une différenciation comme les inhibiteurs d'IDH1/2, il est important d'intégrer dans la stratégie d'analyse la notion de molécules de différenciation. Ces inhibiteurs induisent également un *shift* phénotypique, mais celui-ci se produit au sein de la même lignée myéloïde, vers un stade plus différencié que les blastes du diagnostic. Ainsi une technologie basée sur au moins huit couleurs est-elle nécessaire. De nouveau l'ELN recommande d'utiliser les deux approches combinées appelées : *LAIP based* (la plus rapide et la plus sensible) and *Dfn Approach* (qui permet de s'affranchir des variations antigéniques éventuelles au cours du traitement, mais avec souvent une perte de sensibilité).

Pour la CMF, un prélèvement médullaire est recommandé car il est beaucoup plus apte à mettre en évidence la MRD puisqu'il autorise l'étude d'un plus grand nombre de cellules et qu'il explore le tissu où prend naissance la leucémie.

FIGURE 2



Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par HOSPICES CIVILS LYON le 26/05/2021.

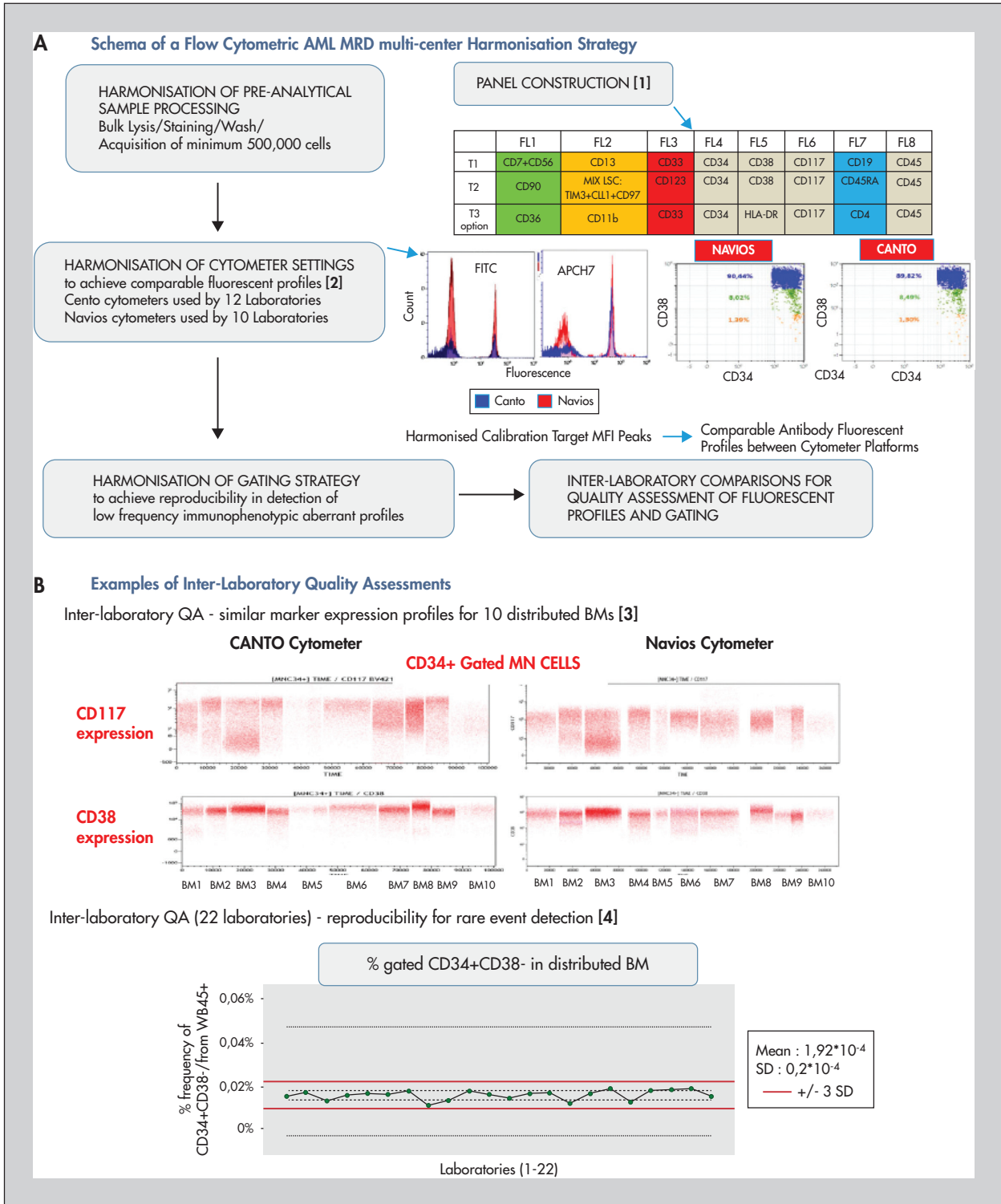
Apport de l'étude, au côté de la MRD en CMF LAIP/DfN et les LSC : impact sur la survie sans rechute, **A**) approche LSC, **B**) approche MRD LAIP/DfN, **C**) approche couplée LSC + MRD [21] (Terwijn 2014).

L'échantillon de moelle est la *gold standard* : c'est le lieu de la leucémie. L'analyse de la régénération médullaire est possible en parallèle de la recherche de blastes, de même que l'exploration du compartiment des cellules souches. Cela permet, par exemple, d'affirmer pour un myélogramme de sortie d'aplasie avec un petit excès de blastes, s'ils correspondent à de la maladie ou de la régénération. Le seuil pratique raisonnablement utilisable pour chaque patient est de 10^{-3} (0,1 %) avec la possibilité de descendre à 10^{-4} (0,01 %) en cas de LAIP très robuste. L'analyse par DfN se cantonnera à un seuil de 10^{-3} .

Les inconvénients de l'analyse de la moelle sont d'abord l'aspect invasif du prélèvement, puis la potentielle dilution sanguine de celui-ci.



FIGURE 3



A) Stratégie appliquée par l'intergroupe ALFA pour l'harmonisation multicentrique de la MRD des LAM par cytométrie en flux. 1] Rationnel du panel MRD LAM: La conception est basée sur la simplicité, la reproductibilité et le coût. Le tube 1 est une combinaison de base pour une approche LAIP et DFN « différent du normal » ; le tube 2 est destiné à la mise en évidence des aberrations des cellules CD34+CD38- (LSC), et le tube 3 est un tube optionnel pour les LAM CD34- et/ou à composante monocytaire. 2] Les réglages de sensibilité des fluorescences des cytomètres en flux ont été harmonisés (« en miroir ») entre les plateformes Canto et Navios.

Dans la moelle, la CMF permet de décrire finement les premières étapes de l'hématopoïèse. Aussi, l'avenir de la MRD en CMF est probablement, à l'instar du myélogramme, la description et l'interprétation immunophénotypique de l'immunoblastogramme : du stade des cellules souches aux premières cellules morphologiquement identifiables.

Afin de répondre à ces exigences, l'Intergroupe français des LAM (Acute Leukemia French Association [ALFA] + French Innovative Leukemia Organization [FILO] + Myechild) réalise un gros travail de structuration et de standardisation, basé sur l'étude récente du groupe français France Flow [23]. Actuellement, le seuil de 0,1 % semble, de manière robuste, facilement atteignable pour l'ensemble des combinaisons (*figure 2*) et des plateformes utilisées. C'est également celui qui semble le plus pertinent dans les études rétrospectives publiées même si de gros efforts techniques sont faits pour atteindre 10^{-4} .

Enfin, l'équipe de Schuurhuis a démontré la complémentarité de l'approche par les cellules souches leucémiques (LSC) dans l'analyse des MRD et la valeur ajoutée des trois approches : LAIP, DfN et LSC (*figure 2*) [19]. De nouveau, l'intergroupe français a développé une stratégie permettant de valider prospectivement les trois approches citées précédemment (*figure 3*) [20].

Un compte rendu de MRD en CMF devrait comporter :

- une évaluation de la représentativité médullaire de l'échantillon (dilution),
- la description des combinaisons utilisées pour l'identification de la MRD (LAIP/DfN/LSC),
- le taux de MRD dont le dénominateur le plus pertinent reste à définir (leucocytes totaux, progéniteurs CD34/CD117, etc.)
- et, dans le cas des MRD non détectables : la limite de détection de la méthode utilisée en comparaison de la régénération hématopoïétique normale.

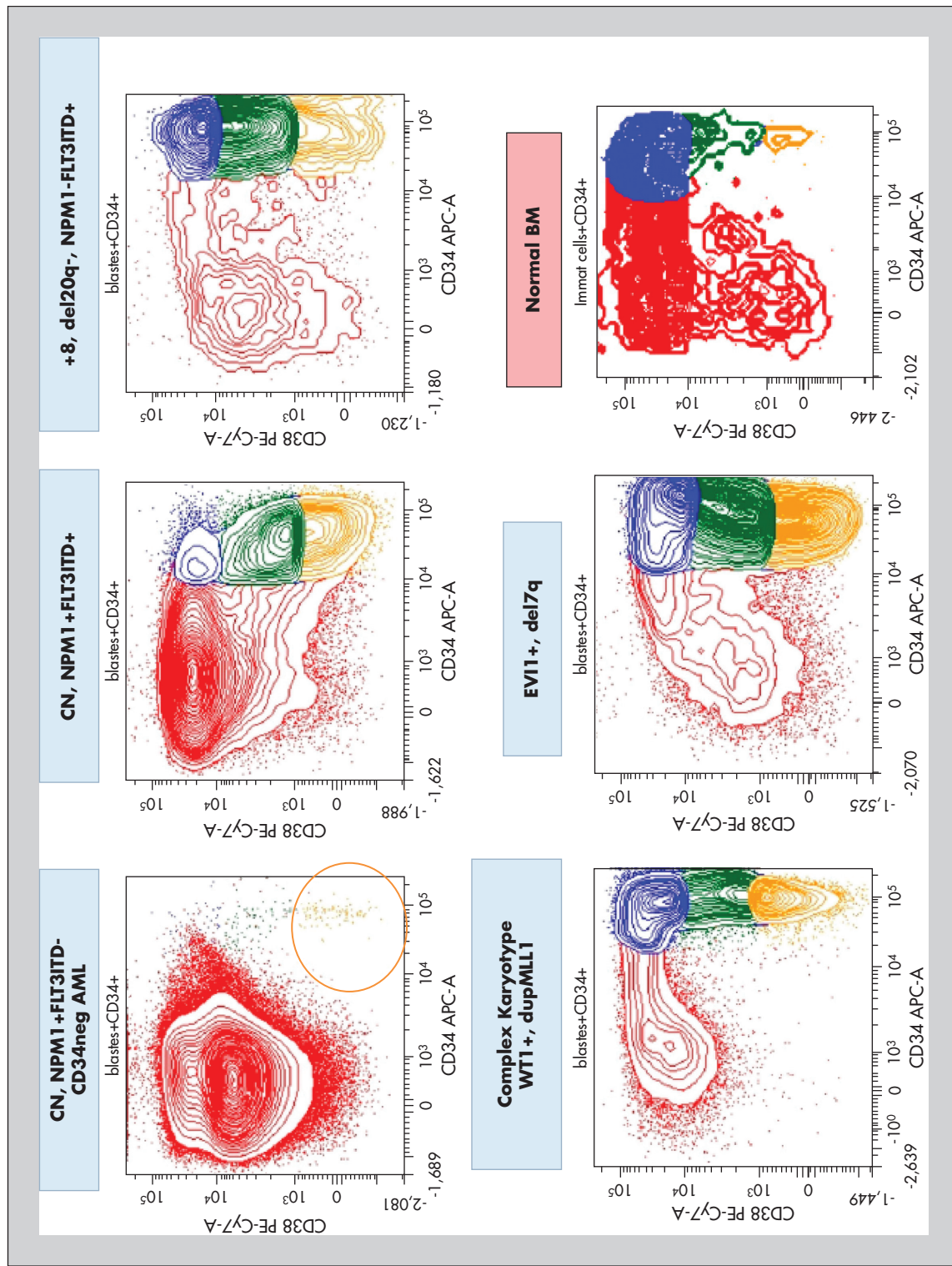
Intérêt de quantifier et caractériser les cellules souches leucémiques dans les leucémies aiguës myéloïdes

Plusieurs études ont montré ces dernières années l'intérêt de l'évaluation de la fréquence des blastes le plus immatures (LSC ou cellule initiatrice de leucémie [LIC]) identifiés dans le compartiment $CD34^+CD38^-$ du *bulk* leucémique au diagnostic et au cours du suivi [21]. Lorsque les blastes $CD45^+/SSC$ sont visualisés dans l'espace biparamétrique CD34/CD38, on observe l'hétérogénéité du *bulk* leucémique et plusieurs groupes de patients associés au profil génomique et moléculaire distinct peuvent être mis en évidence [22] (*figure 4*). Récemment, l'étude de Jentzsch *et al.* [21], sur 169 patients allogreffés, a montré que la fréquence de LSC $CD34^+CD38^-$ des blastes totaux au diagnostic était un facteur pronostique indépendant pour la survie globale et sans rechute, reflétant vraisemblablement l'échappement à l'effet immunitaire antileucémique du greffon (GVL) de cette population.

En parallèle avec l'approche LAIP/DfN dans les protocoles MRD en CMF, l'ALFA prévoit ainsi d'inclure à l'avenir, pour ses essais cliniques, l'évaluation au diagnostic et dans les différents points de suivi de MRD la quantification des LSC dans le compartiment $CD34^+CD38^-$, sur la base des recommandations de l'ELN. Le panel intègre également des marqueurs liés au blocage de la différenciation ou à des expressions aberrantes liés à la leucémogénèse : CD90/CD45RA, CLL1/TIM3/CD97, CD123 et CD7, CD56, CD19, CD13, CD33, CD117, etc.

Enfin, l'un des intérêts majeurs de l'étude du profil d'expression des différents marqueurs dans le compartiment LSC $CD34^+CD38^-$ est d'évaluer les potentielles cibles thérapeutiques afin de proposer un traitement personnalisé pour chaque patient. Récemment, l'équipe du CHU de Lyon [22] a montré l'efficacité de

FIGURE 4



Profil d'expression CD34/CD38 des blastes de 5 LAM au diagnostic, montrant la grande variabilité en fonction des anomalies moléculaires ou cytogénétiques de la fréquence des cellules les plus immatures CD34⁺CD38⁻ (orange) par rapport à une moelle normale. CN : cytogénétique normale.

l'immunothérapie bispécifique anti-CD19/CD3 par blinatumomab chez un patient LAM-CBF en rechute postallogreffe, où l'expression du CD19 est retrouvée dans le *bulk* et les LSC CD34⁺CD38⁻. Identifier, quantifier et caractériser le compartiment LSC CD34⁺CD38⁻ en CMF implique l'évaluation des nouveaux marqueurs et l'étude des fonctions et de la dormance des LSC (GPR56, CD81, CD9, etc.). L'étude en cours au sein du groupe ouvre des pistes prometteuses sur le développement des nouvelles thérapies ciblées et l'évaluation de leur efficacité.

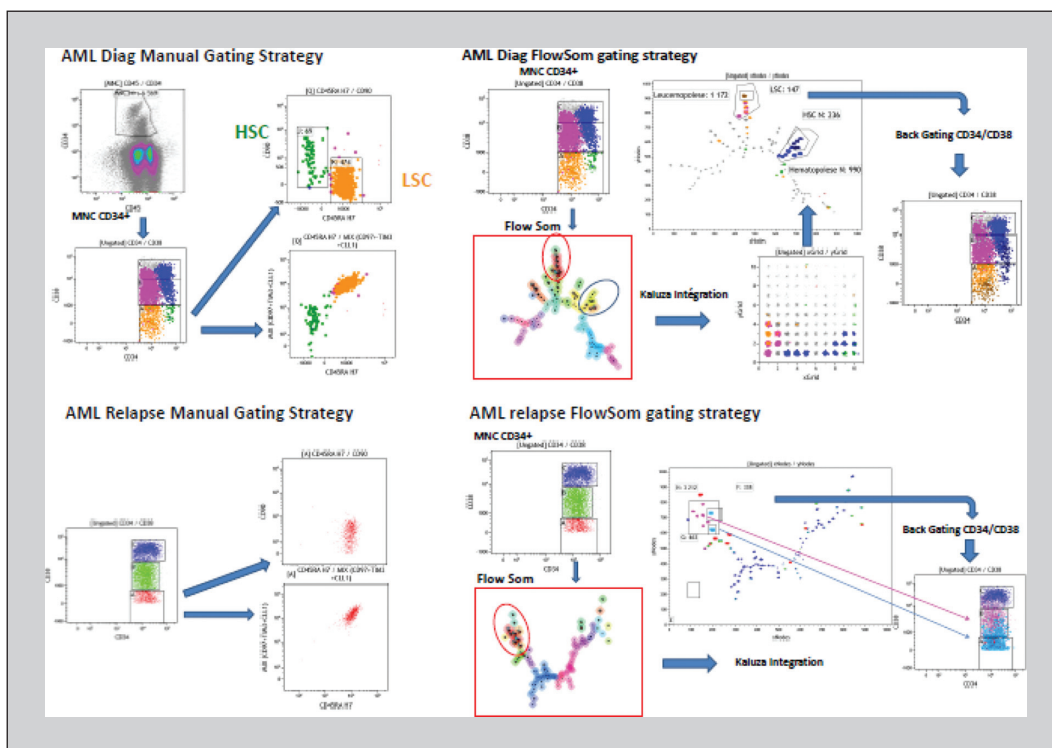
Intérêt de l'analyse non supervisée en cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi de la maladie résiduelle des leucémies aiguës myéloïdes

Avec l'extension du nombre de paramètres accessibles en CMF, la nécessité se fait jour de mettre en place de nouvelles stratégies d'analyse, non plus basées sur des fenêtrages séquentiels, mais aptes à utiliser simultanément l'ensemble des caractéristiques définissant la cellule comme anormale. Ceci peut être réalisé par des approches bio-informatiques et des systèmes d'analyse non supervisée complémentaires au modèle classique. Deux grandes approches sont possibles :

- les algorithmes de réduction de dimension pour la visualisation des données en analyse en composantes principales ou t-SNE (pour *t-distributed stochastic neighbor embedding*),
- des algorithmes de clusterisation non supervisés associés à l'utilisation de carte autoadaptative (SOM, pour *self organizing map*) Flowsom [25-27].

Ces méthodes impliquent une parfaite normalisation des sensibilités d'acquisition pour chacun des canaux de fluorescence, ce qui sous-entend une harmonisation ou,

FIGURE 5



Comparaison entre une méthode d'analyse conventionnelle et une méthode d'analyse non supervisée utilisant la clusterisation FlowSOM pour le fenêtrage des populations d'intérêt CD34/CD38 (nCSH et LSC) au diagnostic et à la rechute d'une LAM.

FIGURE 6

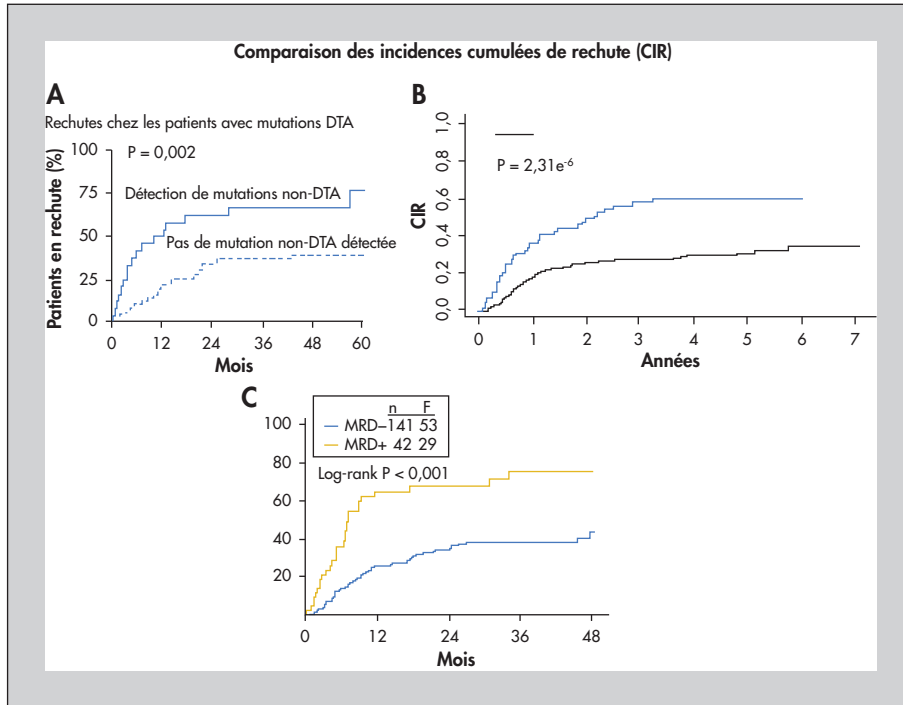


Illustration comparant les incidences cumulées de rechute (CIR) en fonction de la technique utilisée : **A)** NGS, **B)** WT1 et RQ PCR, **C)** cytométrie en flux.

mieux, une standardisation des plateformes impliquées dans le suivi de patients. En effet, il est très difficile de normaliser les fichiers a posteriori comme cela peut être fait en profil d'expression génique sur microarrays. L'utilisation de ces méthodes doit amener les cytométristes à revenir sur certains « dogmes » anciens associés à la CMF, comme de placer les cellules non marquées dans la première décade, les distorsions de signal engendrées par les méthodes de compensation étant particulièrement délétères pour les algorithmes non supervisés. Un important travail de nettoyage des données pour enlever les débris, les doublets, etc., est crucial avant d'injecter les données dans les scripts d'analyses.

Une fois ces modalités prises en compte, ces approches sont prometteuses. Les algorithmes peuvent intégrer les données du diagnostic, de plusieurs points de suivi et enfin des données de référence (hématopoïèse physiologique). Ceci permet d'étudier l'évolution du pattern CMF entre le diagnostic, la MRD et la rechute pour un même patient. Cette approche permet également d'approfondir et de distinguer le pattern de cellules normales (nCSH) *versus* leucémiques (LSC) au sein du compartiment CD34⁺CD38⁻. Enfin, ces approches autorisent une étude comparative du pattern LSCflow par rapport à la signature LSC en génomique utilisant le score LSC17 en nanostring (*figure 5*) [24].

À quel moment et à quelle fin mesurer la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes ? (*figure 1*)

Six situations peuvent être observées :

- mesure de la réponse précoce dans le but d'une stratification thérapeutique essentiellement centrée sur l'allogreffe de moelle,

- évaluation en fin de consolidation, afin d'envisager un traitement d'entretien,
- détection précoce des rechutes par un suivi rapproché et initier la recherche de donneur en vue d'une allogreffe ou d'une autre thérapie,
- adaptation du conditionnement d'allogreffe ?
- après allogreffe de CSH : modulation de l'immunosuppression, injections de lymphocytes du donneur (DLI), mise en place d'un traitement préemptif ou suivi d'un traitement d'entretien (hypométhyliant, inhibiteur de tyrosine kinase, d'IDH1/2, etc.),
- comparaison de l'efficacité d'un bras de traitement par rapport à un autre

En conclusion (figure 6)

Dans les LAM, la MRD est un marqueur pronostique fort, et ce quelle que soit la technique et le matériel biologique utilisés ou le moment où elle est réalisée. L'utilisation des différentes techniques et marqueurs MRD est très complémentaire. Elle devrait, dans l'avenir, permettre une meilleure stratification de la prise en charge et l'introduction de nouveaux médicaments, y compris l'immunothérapie. La place de la MRD comme *surrogate marker* du risque de rechute ou de la survie reste encore floue.

Références

- [1] Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2015 ; 373 (12) : 1136-52.
- [2] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016 ; 374 (23) : 2209-21.
- [3] Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2017 ; 31 : 1482-90.
- [4] Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014 ; 2014 : 222-33.
- [5] Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev* 2017 ; 31 (2) : 63-75.
- [6] Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003 ; 17 (12) : 2318-57.
- [7] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003 ; 17 (12) : 2474-86.
- [8] Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Realtime quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 (31) : 5195-201.
- [9] Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N Engl J Med* 2016 ; 374 (5) : 422-33.
- [10] Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* 2018 ; 32 (2) : 273-84.
- [11] Lesieur A, Nibourel O, Marceau A, et al. Suivi de la maladie résiduelle par quantification des mutations rares de NPM1 par PCR digitale dans les leucémies aigües myéloïdes (LAM). Poster SFH 2019.
- [12] Ferret Y, Boissel N, Helevaut N, et al. Clinical relevance of IDH1/2 mutant allele burden during follow-up in acute myeloid leukemia. A study by the French ALFA group. *Haematologica* 2018 ; 103 (5) : 822-9.
- [13] Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hane-kamp D, et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2018 ; 378 (13) : 1189-99.
- [14] Thol F, Gabdoulline R, Liebich A, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. *Blood* 2018 ; 132 (16) : 1703-13.
- [15] Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N Engl J Med* 2016 ; 374 (5) : 422-33.
- [16] Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction minimal residual disease predicts outcome and benefit from allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation: a study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol* 2017 ; 35 (2) : 185-93.
- [17] Willekens C, Blanchet O, Renneville A, et al. Prospective longterm minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukemia: results of the French CBF-2006 trial. *Haematologica* 2016 ; 101 (3) : 328-35.
- [18] Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: consensus document from ELN MRD Working Party. *Blood* 2018 ; 131 : 1275-91.
- [19] Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2014 ; 9 (9) : e107587.
- [20] Freeman S, Hourigan C. MRD evaluation of AML in clinical practice: are we there yet? *Hematology* 2019 ; 2019 : 557-69.
- [21] Jentzsch M, Bill M, Nicolet D, et al. Prognostic impact of the CD34+/CD38- cell burden in patients with acute myeloid leukemia receiving allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2017 ; 92 : 388-96.
- [22] Plesa A, Labussiere H, Hayette S, et al. Efficiency of blinatumomab in a t



(8;21) acute myeloid leukemia expressing CD19. *Haematologica* 2019 ; 104 : e487-8.

[23] Solly F, Angelot-Delettre F, Ticchioni M, *et al.* Standardization of flow cytometric immunophenotyping for hematological malignancies : the France flow group experience. *Cytometry A* 2019 ; 95 (9) : 1008-18.

[24] Plesa A, Roumier C, Cheok M, *et al.* Stemness signature in AML/GEP with 17

genes score *versus* leukemia stem cell (LSC) quantification by multiparameter flowcytometry (MFC). Poster ASH 2018.

[25] Van Gassen S, Callebaut B, Saeys Y, *et al.* FlowSOM: using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A* 2015 ; 87A : 636-45.

[26] Lacombe F, Lechevalier N, Bene MC. An R-Derived FlowSOM process to analyze

unsupervised clustering of normal and malignant human bone marrow classical flow cytometry data. *Cytometry A* 2019 ; 95 (11) : 1191-7.

[27] Bucklein V, Stein A, Subklewe M, *et al.* FlowSom: an R-based evaluation strategy for flow cytometry-based measurable residual disease (MRD) diagnostic in acute myeloid leukemia (AML). Poster ASH 2019.