

La maladie résiduelle dans les leucémies aiguës lymphoblastiques : aspects biologiques

Emmanuelle Clappier, service d'hématologie biologique, hôpital Saint-Louis, AP-HP, Université de Paris, France

Ludovic Lhermitte, service d'hématologie biologique, hôpital Saint-Louis, AP-HP, Université de Paris, France

Rathana Kim, service d'hématologie biologique, hôpital Saint-Louis, AP-HP, Université de Paris, France

Tirés à part : E. Clappier
emmanuelle.clappier@aphp.fr

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

Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias: biological aspects

Maladie résiduelle, leucémies aiguës lymphoblastiques, MRD moléculaire, MRD cytométrique, biologie moléculaire, cytométrie en flux, biologie des leucémies

Minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia, molecular MRD, phenotypic MRD, molecular biology, flow cytometry

Résumé

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) constituent un groupe hétérogène de maladies, dont le profil de réponse au traitement est très variable. L'évaluation du pronostic et l'adaptation de la stratégie thérapeutique sont fondamentales pour traiter au mieux la maladie dans le cadre d'une médecine toujours plus personnalisée. Au-delà de la caractérisation biologique de la tumeur au diagnostic, l'évaluation fine de la réponse au traitement par la quantification de la maladie résiduelle minimale (MRD) s'est affirmée comme un prédicteur pronostique puissant dans les LAL. Elle est devenue un outil décisionnel pour la stratification thérapeutique des LAL de l'enfant et de l'adulte. Cette revue s'intéresse plus particulièrement aux aspects biologiques de la MRD, en traitant les approches technologiques couramment utilisées dans les laboratoires d'oncohématologie spécialisés. Différentes techniques de biologie moléculaires et la cytométrie en flux sont ainsi décrites, de même que les forces, limites et nouveaux défis inhérents à chaque technologie.

Abstract

Acute lymphoblastic leukemias (ALL) represent a heterogeneous group of diseases with highly variable clinical response to treatment. Prognosis assessment and treatment guidance are essential to personalized medicine. Detection and quantification of minimal residual disease (MRD) has become a strong prognostic predictor in ALL. MRD diagnostics is now guiding treatment decisions in childhood and adult ALL. This review deals with the biological aspects of MRD assessment. It covers technologies usually used in clinical laboratories specialized in onco-hematology. Different molecular techniques and flow cytometry are described, as well as their inherent advantages, limitations and challenges to be met in the near future.

La maladie résiduelle (MRD pour *minimal residual disease*) se définit par le taux de cellules tumorales résiduelles après que la rémission cytologique complète a été obtenue. Au-delà de cette définition stricte, la MRD mesurée à des temps précis par rapport à certaines phases de traitement correspond à une évaluation *in vivo* chez le patient de la

Pour citer cet article : Clappier E, Lhermitte L. La maladie résiduelle dans les leucémies aiguës lymphoblastiques : aspects biologiques. *Hématologie* 2020 ; 26(supplément 1) : 25-38. doi : 10.1684/hma.2020.1544



réponse au traitement, intégrant l'ensemble des facteurs pouvant influencer cette réponse. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) où le concept et les techniques de suivi de la MRD sont le plus abouties à ce jour, cette dernière s'est imposée comme le paramètre le plus prédictif de la réponse à long terme et, par conséquent, un outil majeur pour la stratification thérapeutique basée sur le risque de rechute.

La mesure de la MRD repose sur la capacité à détecter une quantité minime de cellules tumorales au sein d'une population de cellules saines. Il convient ici de noter que le suivi de la MRD reste conditionné par la taille de l'échantillon cellulaire analysé et donc la richesse du prélèvement, quelle que soit la technique. Les différentes méthodes de mesure de la MRD se caractérisent par leur seuil de sensibilité, paramètre lié à la nature du ou des marqueurs tumoraux utilisés, eux-mêmes caractérisés par leur spécificité. Les différentes stratégies, techniques et marqueurs actuellement utilisés ou en cours de développement seront présentés, en distinguant d'abord les approches moléculaires et les approches immunophénotypiques.

Approches moléculaires

Caractéristiques des marqueurs moléculaires

Marqueurs oncogénétiques ou marqueurs immunogénétiques

Idéalement, un marqueur pour le suivi de la MRD serait présent dans toutes les cellules leucémiques et totalement absent des cellules non leucémiques. À cet égard, les altérations génétiques initiatrices de la leucémie semblent particulièrement appropriées. De fait, la quantification de transcrits de fusion tels que BCR-ABL1 a été largement utilisée pour le suivi de la MRD. Des altérations plus tardives dans le processus oncogénique, mais stables au cours de la maladie parce qu'elles confèrent un avantage sélectif ou une résistance au traitement, peuvent être également des marqueurs de suivi pertinents. Cependant, l'importante hétérogénéité génétique des LAL a limité l'utilisation de ces marqueurs qui ne permettaient pas de couvrir de manière exhaustive l'ensemble des LAL, surtout avant l'ère des techniques d'analyse pangénomique à haute résolution. De plus, des variables telles que la cellule d'origine, l'architecture clonale et le taux d'expression de l'oncogène sont à prendre en considération pour interpréter les résultats de MRD sur marqueurs oncogénétiques, rendant difficiles leur exploitation à l'échelle de cohortes de patients et leurs applications cliniques. Même si plusieurs marqueurs oncogénétiques gardent un intérêt pour le suivi de certaines LAL comme les LAL à chromosome Philadelphie (Ph^+), un autre type de marqueur s'est imposé pour les LAL Ph^- , qui sont les séquences génomiques recombinées des gènes des immunoglobulines (Ig) et du récepteur T à l'antigène (TCR), ou marqueurs immunogénétiques. Il s'agit de marqueurs non liés au processus oncogénique mais au processus physiologique de maturation du lymphoblaste. Le processus de maturation normale d'un lymphoblaste comprend la recombinaison des gènes des Ig ou du TCR, qui a pour but de créer une grande diversité de répertoire de récepteurs des cellules T et d'immunoglobulines nécessaires à la reconnaissance antigénique. Pour cela, la recombinaison induit des cassures de l'ADN de manière sélective au niveau des segments V, D et J des différents loci codant les chaînes des IG et du TCR, à la suite de quoi une réparation se produit par ligation entre les segments ainsi réarrangés. Un premier niveau de diversité des séquences des réarrangements Ig/TCR vient de la diversité combinatoire entre les multiples segments V, (D) et J au sein de chaque locus. Cette diversité est encore augmentée par la perte et l'ajout aléatoires de nucléotides au niveau de la jonction par l'action de l'enzyme terminal déoxynucléotidyl transférase (TdT). Il en résulte, au niveau de chaque locus réarrangé, une séquence virtuellement unique dans chaque précurseur lymphocytaire. Bien que bloqués à un stade précoce de leur

développement, les lymphoblastes de LAL ont généralement amorcé le processus de recombinaisons V(D)J avant l'événement de transformation oncogénique et l'expansion clonale. Les séquences des réarrangements Ig/TCR représentent donc des marqueurs génomiques clonospécifiques qui peuvent être mis en évidence dans presque toutes les LAL.

Marqueurs génomiques ou marqueurs transcrits

Toutes les approches moléculaires reposent sur la technique d'amplification moléculaire *in vitro* par PCR (*polymerase chain reaction*) qui permet en principe d'obtenir un signal à partir de l'amplification d'une seule molécule cible. La sensibilité de détection dépend donc

- de la quantité maximale d'acides nucléiques pouvant être analysée,
- de la quantité de molécules de marqueur portées par la cellule tumorale.

Il convient de distinguer les marqueurs génomiques et les marqueurs de type transcrits.

– Les marqueurs dits génomiques sont des séquences d'ADN, présents en une seule copie (un allèle) par cellule. En considérant que la quantité maximale d'ADN pouvant généralement être traitée dans une réaction de PCR équivaut à 100 000 cellules, il en découle que la sensibilité optimale de détection d'un marqueur génomique équivaut à 1 cellule sur 100 000 (10^{-5}). On remarque également que la quantification d'un marqueur génomique peut être directement traduite en taux de cellules tumorales résiduelles.

– Les marqueurs de type transcrit sont des molécules d'ARN messenger et sont donc présents en de multiples copies dans la cellule tumorale. Il en résulte généralement une meilleure sensibilité mais également des inconvénients liés à la nature moins stable de l'ARN et à la difficulté de rapporter un nombre de copies de transcrits à un nombre de cellules tumorales, le nombre de copies de transcrit étant variable selon le niveau d'expression du gène et selon les patients. Le résultat est donc exprimé en ratio du nombre de copies de transcrit tumoral sur le nombre de copies d'un transcrit contrôle ubiquitaire (tels que *ABL1*, *TBP* ou *GUS*).

Réarrangements clonaux des loci des immunoglobulines/récepteur T à l'antigène

Bien que non liés au processus oncogénique, les réarrangements Ig/TCR clonospécifiques représentent d'excellents marqueurs de suivi de la MRD puisqu'ils remplissent le critère de clonospécificité et sont utilisables dans presque la totalité des LAL.

Initiée à la fin des années 1980 [1], la stratégie de détection des cellules leucémiques résiduelles basée sur la reconnaissance des réarrangements Ig/TCR clonospécifiques dans les LAL a connu un développement considérable. Cette opportunité unique de marqueur quasi universel pour un type de tumeur a permis de systématiser le suivi de la MRD dans les LAL et de démontrer son intérêt pronostique, en premier lieu dans les phases précoces du traitement des LAL de l'enfant, en tant que mesure de la qualité de la réponse au traitement [2, 3].

Identification et séquençage des réarrangements clonaux des loci des immunoglobulines/récepteur T à l'antigène

La mise en place du suivi de la MRD repose tout d'abord sur la recherche et le séquençage des réarrangements Ig/TCR clonospécifiques, effectués sur un prélèvement tumoral au diagnostic. La quantification de la MRD dans les prélèvements de rémission est ensuite basée sur des PCR quantitatives en temps réel (Taqman[®]), spécifiques des réarrangements mis en évidence (*figure 1*).



FIGURE 1

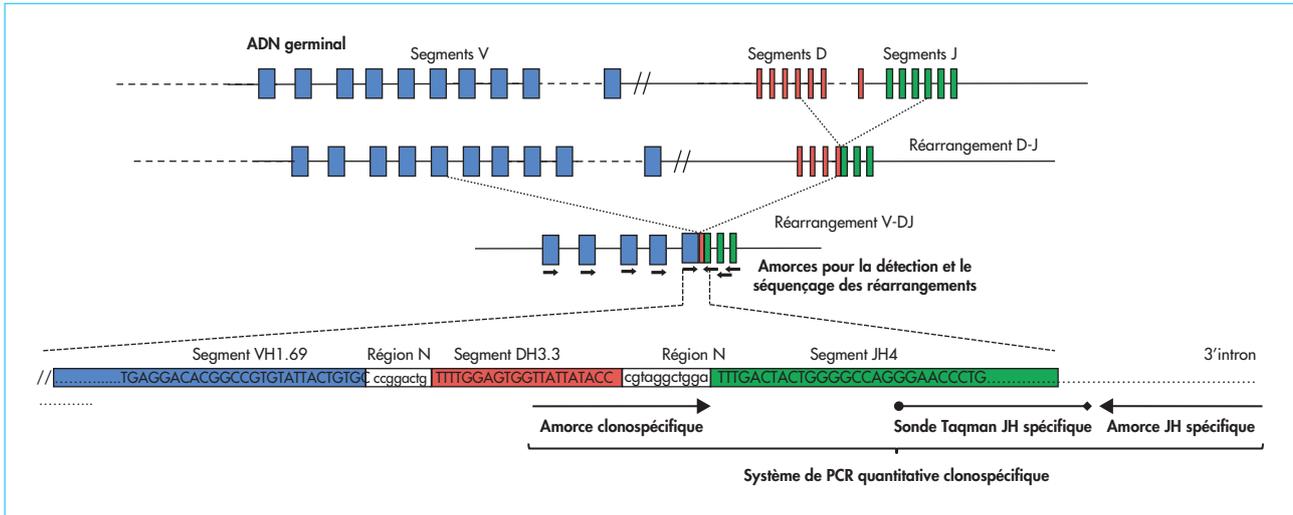


Schéma d'un exemple de réarrangement du locus IgH et de mise au point d'un système de PCR clonospécifique.

L'étape d'identification des réarrangements Ig/TCR est réalisée grâce à des PCR multiplexes utilisant de nombreuses amorces capables de reconnaître les différents segments V, D et J pour les loci d'intérêt. Un réarrangement se traduit par un rapprochement des segments recombinés rendant possible l'amplification, tandis qu'un locus en configuration germinale ne peut pas générer de produit de PCR. Ces loci étant d'une grande complexité, la mise au point de ces systèmes PCR a été rendue possible par un effort collaboratif de nombreux groupes depuis une vingtaine d'années dans le cadre du réseau européen BIOMED [4]. Des protocoles de PCR standardisés pour la mise en évidence des réarrangements Ig/TCR ont ainsi permis de généraliser non seulement le suivi de la MRD dans les LAL mais également la recherche de clonalité moléculaire dans les autres hémopathies lymphoïdes.

Il est important de noter ici que tout réarrangement Ig/TCR peut être utilisé comme marqueur, indépendamment de son caractère productif ou non, en cas de rupture du cadre de lecture ou de réarrangements aberrants par exemple. Les différents loci étant réarrangés de manière séquentielle et ordonnée au cours de la lymphopoïèse, le profil des réarrangements Ig/TCR des LAL est plus ou moins corrélé à leur stade de différenciation. De manière générale, plus le phénotype des lymphoblastes est immature, moins nombreux seront les réarrangements clonaux identifiés. Dans les LAL-T, les réarrangements des loci codant les gènes du TCR se font de manière séquentielle en respectant la thymopoïèse : TCRD > TCRG > TCRB > TCRA [5]. Ainsi les LAL pro-T et/ou de lignage mixte ne présentent souvent aucun réarrangement et dans ce cas, le suivi de la MRD par cette méthode ne sera pas possible. Dans les LAL-B, les réarrangements les plus immatures sont les réarrangements du locus IgH dit incomplets entre les segments D et J, ensuite complétés par le réarrangement de la séquence DJ avec un segment V, puis par le réarrangement du locus IGK.

En plus de ces réarrangements physiologiques, il est observé dans les LAL un phénomène d'infidélité de lignée, correspondant à des réarrangements des loci codant les chaînes du TCR dans les lymphoblastes de LAL-B et, dans une moindre mesure, des réarrangements des loci des Ig dans les lymphoblastes de LAL-T [6, 7]. Ces réarrangements aberrants peuvent, de la même façon que les réarrangements physiologiques, constituer des marqueurs clonospécifiques. Au total, plus de 90-95 % des LAL présentent au moins un réarrangement des loci couramment étudiés [8].

Le séquençage des réarrangements Ig/TCR obtenus était, jusque récemment, réalisé dans un second temps par séquençage Sanger des produits des PCR positives. Depuis quelques années, le développement du séquençage nouvelle génération (NGS) dans la plupart des laboratoires a permis de contracter ces étapes et non seulement de gagner du temps mais également de pouvoir mieux évaluer le caractère clonal des réarrangements. Des outils bio-informatiques dédiés d'analyse des réarrangements Ig/TCR ont été développés, notamment le logiciel Vidjil [9], permettant l'identification aisée des segments réarrangés et des séquences jonctionnelles.

Mise au point des systèmes de PCR quantitative pour les loci des immunoglobulines/récepteur T à l'antigène clonospécifique

L'étape suivante consiste à dessiner sur les séquences réarrangées une amorce pour mettre au point une PCR quantitative (Q-PCR) clonospécifique pour la quantification de la MRD. Pour chaque locus et chaque famille de segments V, D et J, un système PCR est formé d'une amorce et d'une sonde fluorescente (Taqman[®]) consensus, qui doivent être complétés par cette amorce spécifique de la région jonctionnelle.

Il faut signaler ici que plusieurs systèmes devront être dessinés afin d'obtenir dans la mesure du possible deux systèmes PCR performants permettant de suivre deux réarrangements Ig/TCR distincts. Cette recommandation vise à limiter le risque de faux négatifs en cas de perte d'un marqueur, ce qui peut se produire du fait d'une activité recombinase persistante dans les lymphoblastes leucémiques et responsable d'événements de recombinaison additionnels sur les séquences cibles [10].

La dernière étape de la mise en place du système de suivi de la MRD consiste à tester les systèmes PCR pour deux paramètres. D'une part, la capacité à donner un signal quantitatif et reproductible est évaluée sur une gamme de dilution de l'ADN du prélèvement tumoral. D'autre part la spécificité de la PCR est évaluée en testant de l'ADN de leucocytes de sang de sujets sains, dont le but est de mimer un répertoire lymphocytaire en situation de reconstitution physiologique. En effet, des réarrangements polyclonaux lymphocytaires présentant une forte homologie de séquence avec le réarrangement clonospécifique peuvent parfois donner une amplification non spécifique qui serait source de résultat faux positifs. Ces tests permettent donc de choisir, pour chaque patient, les deux systèmes PCR les plus performants, ou, le cas échéant, de modifier les protocoles de PCR ou encore de choisir de nouvelles amorces jusqu'à obtenir des systèmes de suivi acceptables.

Interprétation des données de PCR quantitative sur les loci des immunoglobulines/récepteurs T à l'antigène

Dans les conditions optimales de réalisation, la capacité de détection de la PCR est d'une copie de cible et la sensibilité est donc déterminée par la quantité d'ADN dans la réaction, l'équivalent de 100 000 cellules dans les conditions habituelles, soit 10^{-5} . Cette sensibilité peut être diminuée en cas de PCR ayant une efficacité ou une spécificité suboptimales. De plus, comme rappelé plus haut, une cellularité suffisante du prélèvement est une condition *sine qua non* pour atteindre cette sensibilité optimale. La quantification précise de la MRD est réalisée grâce à une gamme faite à partir de l'ADN du prélèvement au diagnostic du patient dilué dans de l'ADN de leucocytes de sang de sujets sains allant de l'équivalent de 10 000 à 1 blaste dans 100 000 leucocytes normaux, soit 10^{-1} à 10^{-5} . Cette quantification de la MRD requiert donc une détermination exacte du taux de blastes dans l'échantillon diagnostique utilisé.

L'interprétation des données de MRD Ig/TCR suit les recommandations établies par le consortium international EuroMRD [11]. Ces recommandations très précises



ont notamment établi des critères pour établir la sensibilité et le domaine de quantification de chaque analyse et déterminer si l'échantillon testé est positif et quantifiable. L'effort de standardisation des pratiques mené par l'EuroMRD et le programme de contrôles qualités, permettant de garantir la fiabilité des résultats et l'homogénéité interlaboratoires, ont joué un rôle important dans le développement et l'application clinique du suivi de la MRD dans les LAL.

Altérations génétiques

Le paysage génomique des LAL est très hétérogène et dominé par des aneuploïdies et des translocations chromosomiques récurrentes qui, le plus souvent, définissent des sous-types de LAL et correspondent à l'événement oncogénique initiateur de la leucémie. À ces anomalies initiatrices ou primaires s'ajoutent des anomalies secondaires, qui sont, très souvent et de façon caractéristique des LAL, des microdélétions génomiques résultant d'événements de recombinaison V(D)J inappropriée. Bien que les réarrangements clonaux Ig/TCR comme marqueurs de MRD soient des cibles de choix dans les LAL, de nombreuses altérations génétiques peuvent théoriquement servir de marqueurs de MRD. Seuls les marqueurs les plus pertinents et couramment utilisés seront détaillés ci-après.

Fusion BCR-ABL1 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B à chromosome Philadelphie

D'abord développée dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), la détection et la quantification des transcrits de fusion BCR-ABL1 par PCR avec transcriptase inverse (RT-PCR) s'est imposée dans les LAL-B Ph⁺, en particulier dans la communauté de l'hématologie adulte déjà familière avec le suivi moléculaire des LMC [12]. De réalisation apparemment plus simple que le suivi des réarrangements Ig/TCR, la quantification des transcrits BCR-ABL1, effectuée en routine dans de nombreux laboratoires, soulève cependant des questions lorsqu'il s'agit de standardiser les pratiques afin de garantir une reproductibilité interlaboratoire dans le contexte de protocoles de traitement multicentriques. Un sous-groupe du consortium EuroMRD est ainsi dédié à cet objectif de standardisation internationale de la quantification des transcrits BCR-ABL1 dans les LAL Ph⁺ [13]. Comme évoqué plus haut, la réalisation et l'interprétation de la MRD à partir de transcrits ou de séquences génomiques sont fondamentalement différentes, la quantification étant dans un cas rapportée à un transcrit contrôle et dans l'autre exprimée en taux de cellules leucémiques résiduelles. De plus, un taux de transcrit n'est pas seulement fonction du taux de cellules positives mais également du niveau d'expression du gène, susceptible de varier au cours du traitement et entre les patients.

La question de la signification biologique et clinique de la MRD mesurée sur l'un ou l'autre type de marqueur s'est naturellement posée d'abord dans les LAL pédiatriques, où l'importance pronostique de la MRD Ig/TCR était bien établie et au sein desquelles les LAL Ph⁺ représentaient une entité rare. Des études comparant les données de MRD sur réarrangements Ig/TCR et sur les transcrits BCR-ABL1 sur des cohortes de LAL Ph⁺ pédiatriques ont ainsi mis en évidence une faible concordance, les résultats sur BCR-ABL1 étant significativement plus élevés [14]. Afin de s'affranchir d'un potentiel biais d'ordre technique et s'attacher à la comparaison entre la MRD mesurée sur l'altération oncogénique initiatrice de la leucémie, d'une part, et sur un marqueur clonal de différenciation lymphoïde, d'autre part, notre laboratoire ainsi que d'autres groupes ont mis en place une technique de quantification de la MRD à partir des séquences génomiques des points de cassure BCR-ABL1, en utilisant la même méthodologie que pour les réarrangements Ig/TCR [15]. Ces travaux ont permis de démontrer la persistance, chez certains patients, de cellules non lymphoblastiques portant le gène de fusion

BCR-ABL1, traduisant une hématoïèse clonale issue d'une population pré-leucémique. La signification clinique de cette observation reste à déterminer, en particulier si la persistance de cette population traduit une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase qui pourrait se solder par une rechute. Cependant, à l'ère des immunothérapies reposant sur le ciblage des marqueurs lymphoïdes B, il semble important d'être en mesure de discriminer les lymphoblastes leucémiques d'une hématoïèse BCR-ABL1-positif préleucémique. Par conséquent, les deux marqueurs de suivi apparaissent comme complémentaires et devront être évalués en parallèle afin d'établir leurs rôles respectifs dans la prise en charge thérapeutique.

Fusions génomiques impliquant le gène *MLL/KMT2A*

Les LAL-B avec réarrangement du gène *MLL/KMT2A* ont le plus souvent un phénotype immature, de type pro-B, et en accord avec ce blocage de la différenciation à un stade précoce, ces LAL présentent souvent peu de réarrangements Ig/TCR. De plus, les réarrangements observés sont souvent oligoclonaux et instables, avec fréquemment des réarrangements perdus ou acquis lors des rechutes [16]. Pour ces raisons, les réarrangements Ig/TCR ne représentent pas des marqueurs clonaux fiables dans ce sous-type de leucémies et une alternative a été développée, utilisant le réarrangement génomique de *MLL/KMT2A* comme marqueur de MRD. Ceci nécessite de séquencer les points de cassure du réarrangement de *MLL/KMT2A*, ce qui en pratique est réalisé couramment par le laboratoire de R. Marschalek [17], puis de dessiner un système de PCR quantitative complet pour chaque patient. Initialement développée dans le contexte du suivi de la MRD des LAL du nourrisson qui présentent très fréquemment un réarrangement de *MLL/KMT2A* [16], cette stratégie est applicable et pertinente pour l'ensemble des LAL à réarrangement de *MLL/KMT2A* et présente l'avantage de garder les mêmes principes de quantification du taux de cellules résiduelles qu'avec les réarrangements Ig/TCR.

Autres altérations génomiques

De nombreuses anomalies oncogéniques des LAL sont issues d'une activité recombinase inappropriée intervenant au niveau de séquences cryptiques de recombinaison (ou *RSS-like*). Ce type de réarrangements présente des points de cassures regroupés au niveau de ces séquences et il est donc possible de dessiner des amorces de PCR tant pour l'identification de ces réarrangements au diagnostic que pour la quantification de ces séquences cibles. Cette stratégie a été développée notamment pour les microdélétions SIL-TAL1, anomalie observée dans 15 % des LAL-T [4]. Dans les LAL-B, les délétions intragéniques récurrentes d'IKZF1, bien qu'étant des anomalies secondaires, semblent des marqueurs relativement fiables et stables lorsqu'elles sont identifiées dans le clone leucémique majoritaire [18].

Nouvelles approches en développement

La méthode de PCR quantitative demeure la technique de référence, du fait d'une longue expérience et d'un effort d'harmonisation à l'échelle internationale, permettant l'évaluation des données et la stratification thérapeutique au sein de protocoles multicentriques. Cependant, de nouvelles approches de quantification de la MRD sont actuellement en développement, avec l'arrivée de nouvelles technologies : le séquençage haut débit et la PCR digitale en émulsion.

Le séquençage haut débit

La technologie de séquençage haut débit est d'ores et déjà entrée dans les pratiques courantes des laboratoires de MRD des LAL et a remplacé la technique de Sanger



pour le séquençage des réarrangements Ig/TCR clonaux au diagnostic, avec un gain majeur en termes d'efficacité [19]. En revanche, bien que cette technologie puisse théoriquement s'appliquer à l'analyse des prélèvements de suivi, elle ne s'est pas substituée en pratique courante à la technique de référence par Q-PCR. En effet, plusieurs difficultés sont rencontrées et un groupe de travail au sein d'EuroMRD s'est constitué afin d'évaluer et optimiser la faisabilité de cette technique pour l'évaluation de la MRD. Avec la technologie de NGS, l'évaluation de la MRD consiste à amplifier et séquencer l'ensemble des réarrangements pour un locus donné et à identifier au sein de ces séquences (reads) celles correspondant au clone leucémique. Les contaminations intrinsèques représentent un premier problème lorsqu'il s'agit de mettre en évidence des séquences très minoritaires. Une seconde problématique majeure est la normalisation des données de NGS afin de calculer un taux de cellules résiduelles. Une approche simple et qui a déjà été appliquée consiste à rapporter le nombre de séquences clonales sur le nombre de séquences polyclonales. Cependant, le nombre de séquences polyclonales étant lié au taux de lymphocytes (et lymphoblastes non clonaux) présents dans le prélèvement, le taux de MRD calculé pourra donc varier considérablement en fonction de l'importance de la contrepartie lymphoïde normale à un stade donné de la maladie et du traitement. Cette difficulté représente actuellement un frein important à l'utilisation du NGS dans la stratification thérapeutique, jusque-là basée sur des seuils établis de façon robuste par Q-PCR.

L'utilisation actuelle et le bénéfice rapporté du NGS concernent donc davantage des pathologies qui n'ont pas bénéficié auparavant du développement de la Q-PCR, telles que le myélome, et où l'utilisation qui est faite du NGS est le plus souvent uniquement qualitative.

De plus, l'interprétation de la sensibilité des approches de séquençage de haut débit doit tenir compte de la quantité d'ADN utilisée (une cellule diploïde contient 6,8 pg d'ADN), afin d'assurer une cohérence entre les performances technologiques et la réalité biologique.

Bien que l'apport de l'évaluation de la MRD après allogreffe reste incertain, l'expérience avec la technique de référence, la PCR quantitative, rapporte des situations non rares de faux positifs liés à la reconstitution importante du répertoire immunitaire, qui augmente la probabilité de générer des réarrangements proches de ceux identifiés dans le clone leucémique au diagnostic. Dans cette application, l'accès aux séquences présente un avantage.

La PCR digitale par émulsion

La quantification de la MRD par PCR digitale par émulsion présente l'avantage d'utiliser des systèmes de PCR identiques et comparables à la PCR quantitative de référence. Cette approche repose sur le principe de partitionnement de l'ADN en gouttelettes dans lesquelles va se produire une réaction de PCR. Ces gouttelettes vont ensuite être analysées par un lecteur équipé d'un détecteur de signaux fluorescents. Si le réarrangement d'intérêt est présent, la gouttelette va émettre un signal fluorescent d'intérêt. Cette approche technologique a deux avantages majeurs :

- elle ne nécessite pas de gamme de blastes et s'adapte donc aux situations où l'on dispose de prélèvements diagnostiques dont le taux d'infiltration est faible et/ou inconnu,
- la capacité à quantifier de manière précise des MRD faibles, là où la PCR quantitative est en mesure de détecter la présence de blastes de manière non reproductible.

Cette approche, ayant une sensibilité comparable à la PCR quantitative mais un coût actuellement supérieur, fait l'objet d'un groupe de travail et d'une évaluation au sein du consortium EuroMRD.

Approches cellulaires

Les techniques cellulaires d'évaluation de la réponse au traitement sont au contraire des approches moléculaires beaucoup moins variées. La cytologie tient bien entendu une place toujours importante dans les protocoles pour apprécier la corticosensibilité généralement sur le nombre de blastes circulants à J8, et la rémission complète sur le pourcentage de blastes médullaires. La sensibilité limitée de la cytologie et sa faible reproductibilité interobservateurs lorsque les événements deviennent rares (< 5 %) ne lui permettent cependant pas d'accéder à l'évaluation de la MRD. C'est la cytométrie en flux (CMF) qui apparaît alors comme un outil de choix pour rechercher une faible masse tumorale au sein de plusieurs centaines de milliers ou millions de cellules. Son principe est simple et repose sur :

- l'identification au diagnostic d'une signature phénotypique de la leucémie, déviant des populations lymphoïdes normales,
- l'analyse au décours du traitement d'un grand nombre d'événements à la recherche du phénotype leucémique.

De la qualité de la signature phénotypique dépend la spécificité de la technique, et le nombre d'événements détermine la sensibilité.

Signature phénotypique de la leucémie Spécificité

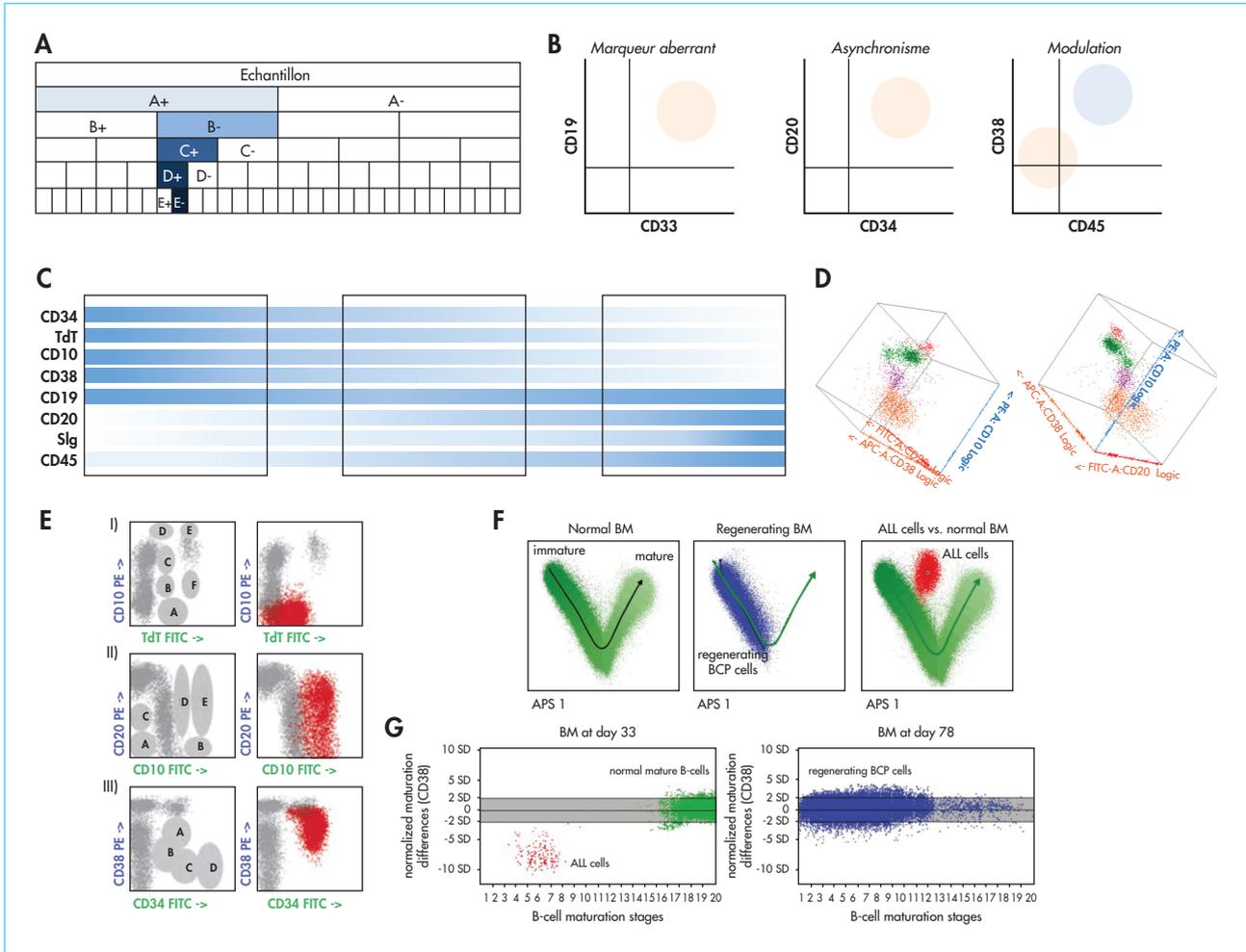
L'étape cruciale de toute étude MRD phénotypique est l'analyse d'un prélèvement frais au diagnostic afin de préciser le profil d'expression antigénique de la leucémie et d'identifier une signature phénotypique déviant du schéma d'expression des populations lymphoïdes normales résiduelles ou régénératives [8]. De manière schématique, la leucémie peut exprimer des antigènes reflétant son lignage, son stade de développement ontogénique et des marqueurs liés au processus oncogénique. Ces marqueurs permettent à la fois d'affilier la leucémie à un lignage au diagnostic, de préciser le stade d'arrêt de maturation et d'identifier des spécificités phénotypiques la distinguant de la lymphopoïèse physiologique. La cytométrie permet, pour chaque événement cellulaire, d'interroger simultanément l'expression de différents antigènes et ainsi d'identifier sa nature lymphocytaire ou autre, son lignage B ou T, son stade immature ou mature, et enfin son caractère pathologique ou physiologique. L'avènement de la cytométrie multiparamétrique au début des années 2000 (8-10 couleurs) permet d'interroger l'expression d'autant de marqueurs à l'échelon cellulaire et ainsi de caractériser avec une grande précision chaque élément pour en préciser la nature (*figure 2A*) [20, 21]. Ceci a considérablement transformé l'évaluation de la MRD par CMF dont l'enjeu dans les LAL-B est de distinguer les lymphoblastes B pathologiques des lymphoblastes B physiologiques de régénération, qui partagent une grande proximité phénotypique. Pour cela, trois types de marqueurs sont classiquement décrits :

- l'expression aberrante, rare et peu stable sous traitement (*figure 2B*),
- l'asynchronisme d'expression, c'est-à-dire un profil phénotypique déviant du schéma de maturation phénotypique physiologique, puissant pour le suivi de la MRD mais peu fréquent,
- la modulation d'expression antigénique, plus fréquente mais qui consiste en de subtiles variations quantitatives d'expression antigénique.

L'identification de ces phénotypes caractéristiques de la leucémie (LAIP, pour *leukemia associated immunophenotype*) présuppose une bonne connaissance des schémas physiologiques de différenciation, et c'est principalement ici que réside toute l'expertise pour l'évaluation MRD par CMF (*figure 2C-E*). Pour le cas



FIGURE 2



A) Intérêt de la cytométrie multiparamétrique. La combinaison de nombreux marqueurs permet d'interroger chaque cellule avec précision et de la caractériser au mieux pour déterminer sa nature : lymphoïde ou non, B ou T, mature ou immature, normale ou anormale (d'après Chattopadhyay [20]).

B) Différentes catégories de marqueurs LAIP (pour leukemia associated immunophenotype). Expression aberrante : la coexpression CD19/CD33 n'existe pas à l'état physiologique; asynchronisme d'expression : le CD34 disparaît physiologiquement avant l'apparition du CD20 si bien que la coexpression du CD34 et du CD20 est nécessairement pathologique ; l'expression de certains marqueurs est modulée dans les LAL-B comme l'expression habituellement plus faible du CD38 et du CD45 sur les blastes leucémiques que ne le voudrait la physiologie. Bleu : lymphoblastes physiologiques; Orange : lymphoblastes pathologiques.

C) Profil d'expression de quelques marqueurs au cours de la lymphopoïèse B. Détermination de différents stades permettant d'apprécier les différents phénotypes physiologiques et de visualiser notamment que la coexpression du CD34 et du CD20 n'existe pas à l'état physiologique.

D) Synthèse du profil d'expression de trois marqueurs antigéniques en trois dimensions (CD10, CD20, CD34). La lymphopoïèse B révèle un phénotype continu avec des modulations antigéniques concomitantes des différents stades de maturation. (rouge, vert, rose et orange : lymphoblastes physiologiques de stades I, II, III et lymphocytes B respectivement).

E) Les schémas phénotypiques récapitulant la normalité, c'est-à-dire le profil d'expression antigénique des lymphoblastes B régénératifs que le biologiste utilise pour l'interprétation des résultats afin d'identifier les phénotypes déviants du profil d'expression physiologique (d'après Lucio *et al.*, *Leukemia* 1999). En gris, lymphoblastes physiologiques ; en rouge et figures géométriques lettrées : lymphoblastes pathologiques.

F) Exemple d'analyse par un outil d'intégration multiparamétrique. En haut, représentation bidimensionnelle en analyse en composante principale intégrant l'expression antigénique de 12 marqueurs par les lymphoblastes B, permettant la discrimination des événements normaux/régénératifs des cellules pathologiques. En bas, représentation de la maturation physiologique sur une ligne de base (gris) et illustration des événements pathologiques résiduels (rouge) dont le phénotype dévie du profil physiologique. Ce type d'outil reproduit de manière automatisée le raisonnement d'intégration des données réalisé par l'expert. Vert : lymphoblastes/-cytes B normaux ; bleu : lymphoblastes régénératifs ; rouge : lymphoblastes B pathologiques (d'après van Dongen *et al.*, *Blood* 2015).

particulier des LAL-T, l'approche peut paraître plus simple. L'identification de lymphoblastes T dans le sang ou la moelle est nécessairement pathologique, puisque la différenciation T précoce a lieu dans un organe dédié, le thymus. Il n'y a donc pas lieu de distinguer lymphoblastes T pathologiques et physiologiques, puisqu'ils sont nécessairement pathologiques. Pour autant, la MRD des LAL-T présente d'autres défis, qui sont de discriminer les lymphoblastes T des cellules NK (cyCD3⁺ smCD3⁻), des cellules myéloïdes et des lymphocytes T matures. En particulier, les LAL ETP (pour *early T-cell progenitors*) ont un phénotype difficile à distinguer de celui de certaines populations myéloïdes, notamment du fait d'une expression faible et/ou hétérogène du cyCD3, ou absente du CD1a et de la TdT. À l'inverse, les LAL-T matures TCR $\gamma\delta$ et surtout $\alpha\beta$ présentent généralement très peu d'aberrations phénotypiques les distinguant des lymphocytes T matures.

Sensibilité de maladie résiduelle phénotypique

La CMF permet l'analyse à l'échelon cellulaire (*single-cell analysis*), mais l'interprétation se fera toujours à l'échelon de la population, tout comme la cytologie. Ceci conditionne directement la sensibilité de la technique : une sensibilité de 10^{-4} nécessitera la détection d'une population d'un *cluster* minimal de 10 événements (jusqu'à 50 selon les auteurs), le *cluster* se définissant comme un groupe d'événements de phénotype homogène. En revanche, la CMF ne peut caractériser un événement unique comme pathologique ce qui implique qu'à sensibilité égale, il est nécessaire d'analyser un plus grand nombre d'événements par CMF que par biologie moléculaire. La quantité et la qualité de l'échantillon sont donc deux facteurs essentiels à la bonne réalisation de la MRD par CMF. L'échantillon doit être riche et représentatif. Les recommandations actuelles préconisent l'acquisition d'un minimum de 1 million d'événements, et jusqu'à plus de 10 millions [22]. De telles acquisitions permettent une sensibilité de l'ordre de 10^{-4} ou moins, rivalisant avec les capacités de détection des techniques moléculaires [23]. Pour cela, des techniques de concentrations cellulaires sont utilisées afin d'enrichir le prélèvement en cellules (mono)nucléées. La classique séparation par gradient de Ficoll est progressivement abandonnée au profit des techniques de leucoconcentration ou de macrolyse, qui induisent moins de biais dans la sélection des populations cellulaires.

L'échantillon doit aussi être de qualité. Au contraire des techniques moléculaires qui analysent l'ADN tant des cellules vivantes que mortes, la CMF est très sensible à la viabilité cellulaire. L'analyse de la MRD sur un prélèvement décongelé est une utopie compte tenu de l'importante mortalité cellulaire induite et des modulations antigéniques induites par le processus de cryopréservation. Pour ces raisons, la MRD ne peut être envisagée que sur prélèvement frais et de moins de 48 h, ce qui impose des contraintes organisationnelles importantes. En effet, la MRD CMF tend à être oligocentralisée sur le territoire, dans un cadre protocolaire impliquant un acheminement rapide de l'échantillon au laboratoire de référence afin de garantir de bonnes conditions d'analyse.

Les écueils de la maladie résiduelle phénotypique

Au-delà du défaut d'informativité de l'immunophénotypage qui peut concerner une minorité de cas (< 5 %), le plus gros écueil de la spécificité de la MRD phénotypique est représenté par la modulation antigénique. L'établissement de la carte d'identité phénotypique est indispensable au diagnostic pour le suivi de la MRD au décours du traitement. Cependant, le traitement peut induire lui-même des modifications d'expression antigénique rendant difficile le suivi lorsque le visage phénotypique de la leucémie change (concept de *moving target*) et peut se confondre avec celui des cellules lymphoïdes physiologiques régénératives. C'est particulièrement le cas sous l'effet des corticoïdes qui ont un effet différenciant sur



la leucémie, qui peut alors perdre ses marqueurs d'immaturité, exprimer des marqueurs de maturité comme le CD20 dans les LAL-B et moduler les autres LAIP compliquant la détection et la quantification de la MRD. De plus, le phénotype au diagnostic peut aussi être hétérogène avec de multiples populations plus ou moins représentées. Une population minoritaire au diagnostic de phénotype déviant du *bulk* leucémique peut passer inaperçue et être à l'origine de la rechute. Il s'agit là du même écueil que celui de la biologie moléculaire qui peut être sujette à l'évolution clonale ou à la survenue d'une nouvelle leucémie, mais il convient de souligner qu'il n'y a pas nécessairement de corrélation entre phénotype et structure clonale. Un défi inexistant jusqu'à il y a peu est apparu ces dernières années. L'avènement des immunothérapies n'a aucun impact sur le suivi moléculaire de la MRD mais handicape sérieusement son suivi phénotypique. Le masquage des épitopes, leur internalisation ou même leur modification structurale induite par le traitement selon un mécanisme génétique ou épigénétique sont autant de facteurs qui peuvent empêcher la détection de master-épitopes. C'est par exemple le cas du CD19 qui devient indétectable sous blinatumomab ou après cellules T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T), privant la CMF d'un antigène majeur pour les stratégies actuelles de détection de la MRD.

L'avenir de la maladie résiduelle phénotypique

Plusieurs évolutions technologiques ou biologiques sont en train de bousculer la MRD par CMF. Naturellement la distinction entre lymphoblastes pathologiques et populations physiologiques résiduelles/régénératives est d'autant plus résolutive que l'on peut combiner de marqueurs dans un même tube afin de caractériser précisément la nature de chaque événement. L'émergence de nouveaux fluorochromes synthétiques et dans le même temps d'instruments toujours plus résolutifs capables de lire davantage de couleurs font que la cytométrie multiparamétrique est progressivement plus adaptée et performante à la caractérisation d'événements rares. Les instruments actuellement 8-10 couleurs seront bientôt remplacés par des instruments 12-15 paramètres et plus. Cette évolution s'accompagne d'une complexité croissante de l'analyse des données CMF où le biologiste doit intégrer simultanément l'expression de plus d'une dizaine de paramètres. Cette complexité a suscité le développement d'outils logiciels d'aide à l'analyse des données MRD en intégrant les données phénotypiques multiparamétriques à l'échelon cellulaire et recherchant un profil phénotypique déviant de l'hématopoïèse normale résiduelle/régénérative. De nombreux logiciels s'appuient sur cette approche avec de nouvelles représentations graphiques de synthèse de données multidimensionnelles parmi lesquels nous citerons FlowSom [24] et Infinicyt (Cytognos[®]) [25-27], probablement les plus populaires dans le domaine à l'heure actuelle (*figure 2F*). Il convient de souligner cependant que ces outils sont encore du domaine de la recherche et développement, à l'heure actuelle, et n'ont pas encore leur place dans la cytométrie clinique au quotidien. Autre progrès considérable des cytomètres, la digitalisation du signal et la révolution informatique permettent l'acquisition plus rapide d'un bien plus grand nombre d'événements. Une évaluation de MRD sur 10 millions d'événements reste fastidieuse aujourd'hui mais sera certainement très abordable demain. Les capacités de phénotypage pourront s'accroître considérablement en pratique clinique, à l'image des capacités de séquençage : ceci a fait émerger dans la communauté des cytométristes le concept de NGF (*next generation flow*) sur la capacité à analyser à haut débit et à un échelon *single-cell* un grand nombre de cellules, imitant bien entendu le concept de NGS qui repose, lui, sur la capacité à analyser à haut débit et à un échelon *single-cell molecule* une grande quantité d'ADN [22, 28]. Il s'agit là sans doute plus d'un slogan que d'une révolution, témoignant peut-être de la volonté des cellularistes de rester dans la course de la MRD ; il n'en

demeure pas moins qu'au-delà du terme, certes grandiloquent, il existe un réel progrès dans l'approche cytométrique de la MRD.

Enfin, dernier axe d'évolution future de la MRD par CMF, la standardisation a longtemps fait défaut dans la cytométrie clinique. De réels efforts ont récemment été déployés pour standardiser les instruments et harmoniser les panels d'immunophénotypage dans le diagnostic et le suivi de la MRD. Il est considérablement plus difficile de standardiser la cytométrie que la biologie moléculaire, notamment du fait qu'il est possible de synthétiser n'importe quelle séquence oligonucléotidique et de comparer les performances de différentes stratégies, tandis qu'en CMF le développement d'un anticorps est beaucoup plus long, et de nouveaux fluorochromes apparaissent continuellement. Il en résulte qu'une stratégie optimale à un temps t devient obsolète en quelques années, pouvant rendre vains les efforts de standardisation. Néanmoins d'importants travaux sont effectués dans ce sens afin de limiter au maximum la variabilité interlaboratoire, au moins au sein d'un même protocole national ou international.

Conclusions, perspectives

Le suivi de la MRD est devenu un élément pronostique et stratifiant majeur dans la plupart des protocoles thérapeutiques modernes des LAL pédiatriques et maintenant de l'adulte. On distingue les approches cellulaires et moléculaires, qui reposent sur des concepts biologiques et technologiques très différents. Pour autant, ces approches ne s'opposent pas, et bien au contraire, apparaissent complémentaires au quotidien. D'une part, l'informativité de ces deux techniques n'est pas optimale dans toutes les LAL, ce qui accentue la complémentarité de ces deux approches. De plus, la confrontation des MRD phénotypique et moléculaire permet un rendu intégré de la MRD et d'éviter certains écueils, comme une rechute sous-clonale ou d'un autre clone qui pourrait échapper à la biologie moléculaire, ou un faux négatif de la cytométrie dans le cadre de la rechute d'un même clone mais avec des modulations phénotypiques majeures comme cela peut être observé par exemple dans les LAL-B CD19⁻ après blinatumomab ou CAR-T. Il n'y a donc pas de supériorité validée de l'une ou l'autre des approches. Dans le cadre protocolaire, il reste cependant à noter que seule la MRD moléculaire est stratifiante dans la plupart des protocoles thérapeutiques européens, alors que c'est la cytométrie qui est le plus généralement utilisée dans les protocoles nord-américains.

Références

- [1] d'Auriol L, Macintyre E, Galibert F, Sigaux F. *In vitro* amplification of T cell gamma gene rearrangements: a new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 1989 ; 3 : 155-8.
- [2] Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suci S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998 ; 339 : 591-8.
- [3] van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer R, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998 ; 352 : 1731-8.
- [4] Pongers-Willemsse MJ, Seriu T, Stolz F, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999 ; 13 : 110-8.
- [5] Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, et al. Analysis of TCR, pT α and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood* 2003 ; 101 : 2693-703.
- [6] Szczepan'ski T, Pongers-Willemsse MJ, Langerak AW, et al. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. *Blood* 1999 ; 93 : 4079-85.
- [7] Brumt C, Delabesse E, Beldjord K, et al. The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. *Blood* 2000 ; 96 : 2254-61.
- [8] van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast and standardized technologies. *Blood* 2015 ; 125 : 3996-4009.
- [9] Duez M, Giraud M, Herbert R, Rocher T, Salson M, Thonier F. Vidjil: a web platform for analysis of high-throughput repertoire sequencing. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0166126.
- [10] Szczepan'ski T, Willemsse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection

of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood* 2002 ; 99 : 2315-23.

[11] van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, *et al.* Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007 ; 21 : 604-11.

[12] Scheuring UJ, Pfeifer H, Wassmann B, *et al.* Serial minimal residual disease (MRD) analysis as a predictor of response duration in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL) during imatinib treatment. *Leukemia* 2003 ; 17 : 1700-6.

[13] Pfeifer H, Cazzaniga G, van der Velden VHJ, *et al.* Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph + ALL) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1. *Leukemia* 2019 ; 33 : 1910-22.

[14] Zaliova M, Fronkova E, Krejčikova K, *et al.* Quantification of fusion transcript reveals a subgroup with distinct biological properties and predicts relapse in BCR/ABL-positive ALL: implications for residual disease monitoring. *Leukemia* 2009 ; 23 : 944-51.

[15] Hovorkova L, Zaliova M, Venn NC, *et al.* Monitoring of childhood ALL using BCR-ABL1 genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology. *Blood* 2017 ; 129 : 2771-81.

[16] Van der Velden VH, Corral L, Valsecchi MG, *et al.* Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009 ; 23 : 1073-9.

[17] Meyer C, Burmeister T, Gröger D, *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* 2018 ; 32 : 273-84.

[18] Caye A, Beldjord K, Mass-Malo K, *et al.* Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2013 ; 98 : 597-601.

[19] Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, *et al.* Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia* 2019 ; 33 : 2241-53.

[20] Chattopadhyay PK, Hogerkerp C-M, Roederer M. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology* 2008 ; 125 : 441-9.

[21] Chattopadhyay PK, Roederer M. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods* 2012 ; 57 : 251-8.

[22] Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, *et al.* Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-

cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017 ; 129 : 347-57.

[23] Garand R, Beldjord K, Cavé H, *et al.* Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia* 2013 ; 27 : 370-6.

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

[25] Pedreira CE, Costa ESD, Lecrevisse Q, *et al.* From big flow cytometry datasets to smart diagnostic strategies: the EuroFlow approach. *J Immun Methods* 2019 ; 475 : 112631.

[26] Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJ, Orfao A, EuroFlow Consortium. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol* 2013 ; 31 : 415-25.

[27] Pedreira CE, Costa ES, Arroyo ME, Almeida J, Orfao A. A multidimensional classification approach for the automated analysis of flow cytometry data. *IEEE Trans Biomed Eng* 2008 ; 55 : 1155-62.

[28] Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, *et al.* Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017 ; 31 : 2094-103.