

Place de la maladie résiduelle dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes

Claude Preudhomme, Laboratoire d'hématologie, CHRU de Lille, France
 Université de Lille, UMR-S 1172, JPArc, Centre de recherche Jean-Pierre Aubert, neurosciences et cancer, Lille, France
 Inserm, UMR-S 1172, Lille, France

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

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

Role of minimal residual disease in the management of acute myeloid leukaemias

Maladie résiduelle, leucémies aiguës myéloïdes, leucémies aiguës promyélocyaires
 Minimal residual disease, acute myeloid leukaemias, acute promyelocytic leukaemias

Résumé

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent une entité très hétérogène dont le pronostic reste très péjoratif malgré des progrès considérables observés ces dernières années, notamment dans le domaine de la biologie moléculaire. La maladie résiduelle (MRD) permet, sur le plan théorique, d'avoir en un seul test une vision globale des critères de 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 mutées NPM1. Les raisons principales en sont la faible sensibilité des techniques utilisées pour les autres sous-groupes moléculaires et l'absence d'homogénéisation, d'une part, des techniques utilisées, et d'autre part du matériel utilisé (sang *versus* moelle osseuse) ainsi que des temps d'analyse réalisés 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.

Abstract

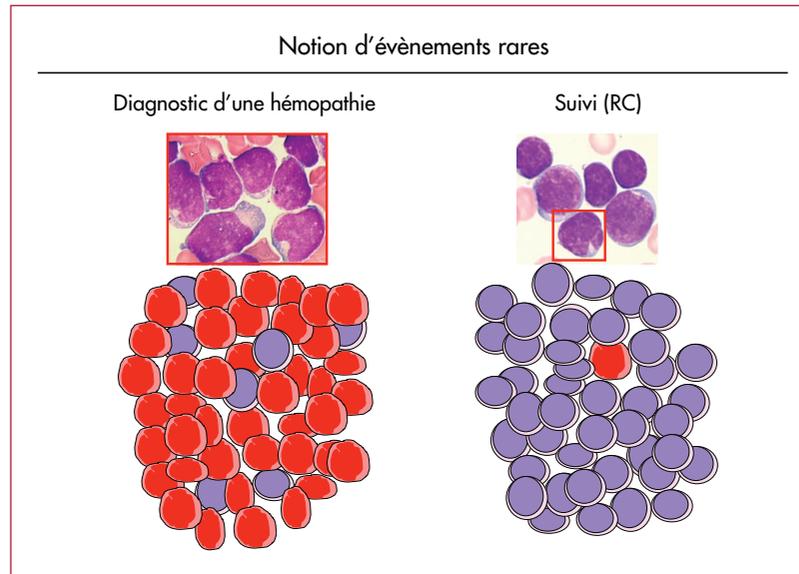
Acute myeloid leukaemias (AML) are a very heterogeneous entity whose prognosis remains very poor despite considerable progress in recent years, partly due to molecular biology. Minimal residual disease (MRD) theoretically provides a global view of treatment response criteria in a single test. Although 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, acute promyelocytic, core binding factor or NPM1 mutated leukaemias. This is mainly due to a lack of sensitivity of the techniques used for the other molecular subgroups and to the lack of homogenization of the techniques and tissue used (blood versus bone marrow) as well as the time point analysis performed in retrospective protocol studies. 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 le sous-groupe d'hémopathies malignes le plus hétérogène, que ce soit sur le plan morphologique, immunophénotypique 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. Celle-ci demeure toutefois médiocre, en particulier chez le sujet âgé [1, 2]. L'utilisation de tests postthérapeutiques permettant d'évaluer globalement la

Pour citer cet article : Preudhomme C. Place de la maladie résiduelle dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. Preudhomme C. *Hématologie* 2019 ; vol. supplément 2, juin : 3-16. doi : 10.1684/hma.2019.1463



FIGURE 1



Représentation schématique du nombre de cellules tumorales (en rouge) dans le prélèvement du diagnostic et dans le prélèvement correspondant à la rémission complète (RC).

réponse ou la persistance de maladie résiduelle (MRD) – termes progressivement remplacé par celui de mesure de la maladie résiduelle – devrait permettre d'améliorer encore cette stratification et d'assurer une meilleure prise en charge thérapeutique [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 [NFS] et myélogramme), qui sont résistantes à la chimiothérapie et responsables de la rechute (*figure 1*).

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, le métabolisme des drogues et la réponse immunitaire antitumorale. Elle est donc un facteur pronostique puissant et indépendant des facteurs préthérapeutiques [4, 5].

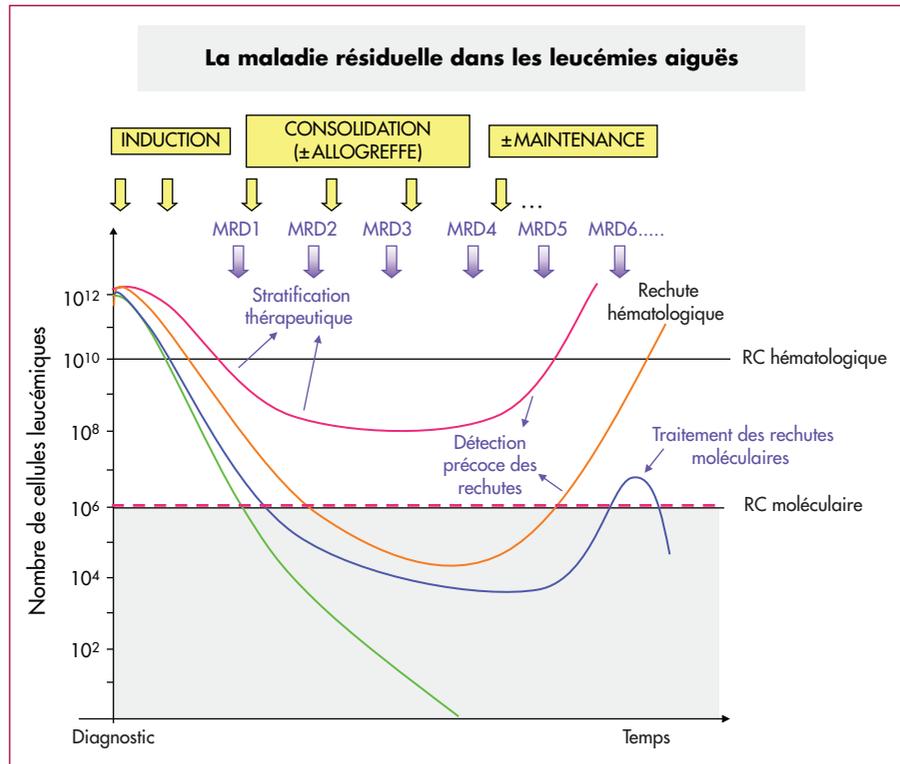
Au diagnostic d'une leucémie, l'organisme est envahi par 10^{11} à 10^{12} cellules tumorales, Le but du traitement d'induction est d'obtenir la rémission complète hématologique (RCH), la normalisation de l'hémogramme et moins de 5 % de blastes dans la moelle, c'est-à-dire une réduction d'environ 1 à 2 \log_{10} (facteur 10 à 100) de la blastose initiale (*figure 2*).

Cependant, la RCH peut représenter une masse tumorale encore très importante : théoriquement entre 0 et 10^9 cellules tumorales

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.

Il est important de noter que les techniques disponibles aujourd'hui, même les plus sensibles, ne permettent pas de descendre en dessous de 10^{-6} (une cellule leucémique sur 10^6), la zone inférieure à 10^{-6} représentée en gris sur la *figure 2* est

FIGURE 2



Représentation schématique de différentes évolutions de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës après traitement intensif, ainsi que les indications du suivi de la MRD en fonction de la période de prélèvement.

inaccessible aux explorations. Une rémission complète moléculaire (MRD indétectable) ne signifie donc pas une MRD négative (figure 3).

Pourquoi étudier la maladie résiduelle ?

- Pour établir de manière reproductible, objective et sensible le statut de rémission.
- Comme marqueur pronostique de chimiosensibilité et pour améliorer la stratification thérapeutique à côté des autres marqueurs pronostiques.
- Pour réaliser le suivi pendant le traitement et identifier plus tôt une rechute éventuelle.
- Pour avoir un marqueur de réponse lors de tests de nouvelles molécules.

Quels sont les critères de choix du ou des marqueurs ?

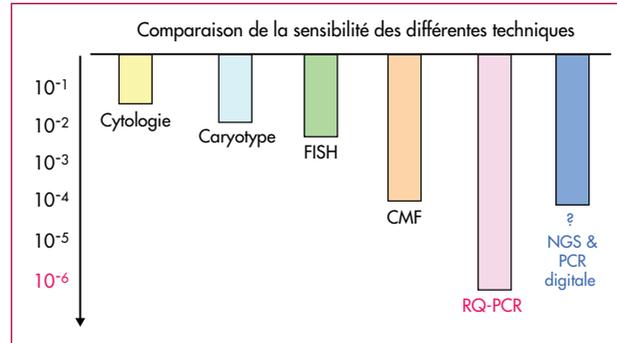
Les critères majeurs sont que le marqueur doit [5] :

- avoir la plus grande sensibilité possible,
- être spécifique de la maladie,
- être stable entre le diagnostic et la rechute,
- être applicable à un grand nombre de patients,
- être détectable par une technique facilement réalisable en routine hospitalière,
- résulter d'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 %



FIGURE 3



Comparaison de la sensibilité des différentes techniques utilisées pour le suivi de la MRD.

des marqueurs, selon l'âge ; viennent ensuite les marqueurs aberrants (LAIP, pour *leukemia aberrant immunophenotype*) et les cellules souches leucémiques (CSL) quantifiés par cytométrie en flux et enfin la quantification de WT 1 et de certaines mutations (figure 3).

Quelles sont les techniques utilisées pour les marqueurs moléculaires ?

La PCR quantitative en temps réel (RQPCR) est recommandée en priorité, pour des raisons de sensibilité et du fait de sa standardisation sur de nombreux marqueurs – Runx1-RUNX1t1, cbfB-MYH11, PMLRARA (biomed 2 [6, 7], wt1 (European Leukemia Net [ELN]) [8] –. Sur les transcrits de fusion, la sensibilité est comprise entre 10^{-4} et 10^{-6} , selon les transcrits. La sensibilité vis-à-vis de *WT1* est beaucoup plus faible, non pas du fait de la technique, mais en raison du bruit de fond dû à l'expression de *WT1* dans les cellules souches hématopoïétiques normales. Pour ces raisons, l'ELN [9] a récemment recommandé de n'utiliser ce marqueur que s'il n'existe pas d'autres marqueurs moléculaires ni de marqueurs suivables par cytométrie de flux (CMF). Ce point sera discuté dans le chapitre des applications cliniques.

Pour les transcrits de fusion impliquant le gène *MLL/HRX*, comme on en emploie 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) [11] pourrait être une alternative intéressante. La rareté de ces derniers et la difficulté technique pour le gène *MLL* (pour *mixed lineage leukemia*) nécessitent une centralisation nationale.

En l'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) [12, 13]. Pour des raisons pratiques, la ddPCR est essentiellement envisageable sur les hot-spots tels que les mutations *IDH1/IDH2*, *DNMT3R882*, *N/KRAS*, *Ckit* ou *FLT3TKD*. Sur le plan de la sensibilité, elle est comprise entre 10^{-3} et 10^{-4} en fonction du marqueur et de la technologie utilisée [10].

La seconde approche est le NGS, qui, sur le plan théorique, devrait être plus sensible que la ddPCR. Toutefois, la sensibilité sera fonction de la quantité d'ADN dans la prise d'essai (impossible d'atteindre 10^{-5} avec une prise d'essai de 50 ng d'ADN, même avec l'obtention de 500 000 reads par échantillon), elle sera fonction de la qualité des séquences obtenues et du bruit de fond (recommandation d'utiliser des barcodes moléculaires). Son utilisation est actuellement peu développée, en raison des difficultés techniques, notamment bio-informatiques, et, surtout, de son coût très élevé pour des analyses prospectives.

De manière générale, les mutations touchant les tyrosines kinases (FLT3ITD et TKD, N/K RAS, C-KIT) ne sont pas recommandées comme marqueurs, car instables entre le diagnostic et la rechute [9], de même que 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 ou IDH1/2, doivent si possible être quantifiés avec d'autres marqueurs [14-16].

Sur le plan de la sensibilité, les techniques réalisées sur la moelle présentent une meilleure sensibilité que sur le sang. Néanmoins une meilleure corrélation avec l'évolution clinique (rechute) a récemment été rapportée pour le suivi de NPM1, de RUNX1-RUNX1T1 en fin de traitement et de WT1 (meilleure sensibilité sur le sang du fait de la diminution du bruit de fond) [8, 17-19].

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

Pour la PCR quantitative (qPCR), l'ELN [9] recommande l'utilisation de l'ADNc plutôt que de l'ADN, spécialement pour les transcrits de fusion et les mutations NPM1. Chaque analyse doit être effectuée en triple exemplaire ; si deux des trois réplicats ont une valeur de CT (pour *cycle threshold*) ≤ 40 , l'échantillon est considéré comme positif selon les recommandations de l'European Code Against Cancer (ECAC). 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 $1 \log_{10}$, le diagnostic de rechute moléculaire est confirmé.

Dans les leucémies aiguës myéloïdes, quelle approche méthodologique utiliser en cytométrie de 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) [20, 21].

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, l'expression d'une série de marqueurs membranaires accompagne chaque étape de la différenciation, ceci avec un ordonnancement très rigoureux.

En revanche, cet ordonnancement est 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 la différenciation. Ces anomalies sont mises en évidence par la CMF grâce à deux stratégies d'analyse :

- soit le suivi des LAIP mises en évidence au diagnostic,
- soit celle dite DfN (pour *different from normal cells*) [9], qui repose sur la mise en évidence de cellules présentant des caractéristiques les différenciant de l'hématopoïèse normale.

Cette deuxième approche ne nécessite pas de connaître l'immunophénotype au diagnostic et peut également détecter l'apparition de nouveaux marqueurs apparaissant sur les blastes au cours de la maladie et de son traitement



(*shift* d'immunophénotype) ; ceux-ci seront de plus en plus fréquemment observés du fait des nouvelles modalités thérapeutiques : anticorps monoclonaux (e.g., gemtuzumab, ozogamicine [GO]) ou cellules T exprimant des récepteurs chimériques [CAR-T cells].

La différence entre les deux approches est tout à fait minime, une parfaite connaissance des caractéristiques immunologiques de chaque élément et de chaque stade de l'hématopoïèse étant le préalable à toute étude de MRD en CMF, que ce soit par l'une ou par l'autre technique. L'évolution des cytomètres de flux qui, permettant actuellement de suivre en routine de huit à quatorze marqueurs ayant des fluorescences différentes, autorise l'utilisation de larges panels d'anticorps, de plus en plus aptes à caractériser les cellules leucémiques et hématopoïétiques normales à tous leurs stades de maturation (voir les recommandations de l'ELN). Ainsi, une technologie basée sur au moins huit couleurs est nécessaire (*tableau 1*). De même, l'ELN recommande d'utiliser les deux approches combinées appelées : *LAIP based* (la plus rapide et la plus sensible) & *Dfn Approach* (qui permet de s'affranchir des variations antigéniques éventuelles, mais, souvent, avec une perte de sensibilité).

Pour la CMF, le prélèvement médullaire est actuellement 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 reflétant la globalité de l'hématopoïèse. On peut rappeler que, dans le sang, le passage des blastes n'est souvent que très partiel. Ainsi, pour mémoire, pour un patient ne présentant pas de leucopénie, atteindre une limite de détection de la MRD à 10^{-6} avec une population statistique minimale de trente à cinquante cellules nécessitera d'analyser un échantillon d'au minimum 15 à 20 mL de sang. Théoriquement, si la combinaison suivie est assez robuste pour détecter spécifiquement les blastes leucémiques, 100 cellules leucémiques seront caractérisées parmi les hémoblastes circulants, qui représentent, pour ce volume de sang, environ 20 000 à 100 000 cellules. Statistiquement, l'affirmation de la détection d'une population aberrante implique la mise en évidence d'au moins trente à cinquante cellules hors des étapes techniques de lyse des hématies, de marquage et de lavage post-marquage, qui entraînent nécessairement une perte de cellules. Ainsi, même si des travaux sur le sang sont en cours, avec une réalisation technique locale en utilisant des panels communs, au moins huit couleurs et une interprétation plus ou moins centralisée en fonction des expériences des uns et des autres, il est ambitieux d'espérer atteindre des sensibilités de détection fortes sur le sang.

En résumé, les éléments concrets qui vont à l'encontre de l'analyse sur le sang sont :

- l'absence d'image de la régénération,
- une représentativité de la leucémie limitée par la partialité aléatoire du passage sanguin des blastes (10 %, 1 % ou moins),
- un volume de sang important pour atteindre une profondeur suffisante.

L'analyse de la MRD sur le sang ne peut être envisagée que comme une alternative par défaut de moelle avec un seuil de détection autour de 10^{-5} dont la valeur n'est pas comparable au seuil obtenu dans la moelle (les leucocytes utilisés comme dénominateur de ce seuil étant différents dans le sang et la moelle).

L'échantillon de moelle reste le *gold standard* [9] : c'est le lieu de la leucémie. L'analyse de la régénération médullaire est possible, en parallèle de la recherche de blastes. 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, une rémission immunophénotypique. Le seuil de sensibilité raisonnablement utilisable avec les techniques actuelles est de 10^{-3} , avec la possibilité de descendre à 10^{-4} en cas de LAIP très robuste. L'analyse par Dfn se cantonnera à un seuil de 10^{-3} , cette méthode étant basée essentiellement sur

l'expertise de l'opérateur à différencier les populations normales des populations aberrantes. Les inconvénients de l'analyse de la moelle sont, d'abord, l'intrusivité du prélèvement et, ensuite, la potentielle dilution sanguine de celui-ci.

Dans la moelle, la CMF permet de « décortiquer » les premières étapes de l'hématopoïèse ; aussi cette technique sera-t-elle probablement employée à l'avenir, et à l'instar du myélogramme, pour faire la description et l'interprétation immunophénotypique de l'hémoblastogramme, depuis les cellules souches jusqu'aux premières cellules morphologiquement identifiables. Dans cette optique, l'accessibilité en pratique quotidienne de laboratoire d'algorithmes d'analyse non supervisée (Tsne, Flowsom, ACP, etc.) contribuera à sa réalisation [22-24].

Actuellement, l'intergroupe Français des LAM (ALFA+FILO+Myechild) réalise un gros travail de structuration et de standardisation afin de répondre à ces exigences. Le seuil de 0,1 % semble aujourd'hui facilement atteignable, et de manière robuste, pour l'ensemble des combinaisons (*tableau 1*) et des plateformes utilisées et c'est également celui qui semble le plus pertinent dans les études rétrospectives publiées. Pour autant, de gros efforts techniques sont actuellement réalisés pour atteindre le seuil de 10^{-4} .

Enfin, quelques équipes travaillent sur le suivi des CSL [25]. Les résultats obtenus sont encourageants, mais non superposables et plutôt complémentaires avec la stratégie LAIP based & Dfn Approach (*figure 4*). De nouveau, l'intergroupe français a développé une stratégie permettant de valider prospectivement les trois approches citées précédemment.

Actuellement un compte rendu de MRD en CMF doit comporter :

- une évaluation de la représentativité médullaire de l'échantillon,
- la description des combinaisons utilisées pour l'identification de la MRD,
- le taux de MRD dont le dénominateur le plus pertinent reste à définir (un consensus existe actuellement autour des leucocytes CD45⁺).
- dans le cas des MRD non détectées : la limite de sensibilité de détection en fonction de la régénération hématopoïétique normale.

À l'avenir, le compte rendu d'une étude médullaire par CMF devrait ressembler à ce qui se fait en cytologie pour le myélogramme focalisé dans le contingent des progéniteurs hématopoïétiques. La classification des étapes immunophénotypique de l'hémoblastogramme reste à construire, ainsi que la détermination des valeurs de référence pour chacune des sous-populations définies.

À quel moment et dans quel but mesurer la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes ?

Six situations peuvent être observées (*figure 2*) :

- mesure de la réponse précoce en vue d'une stratification thérapeutique, essentiellement centrée sur l'allogreffe de moelle,

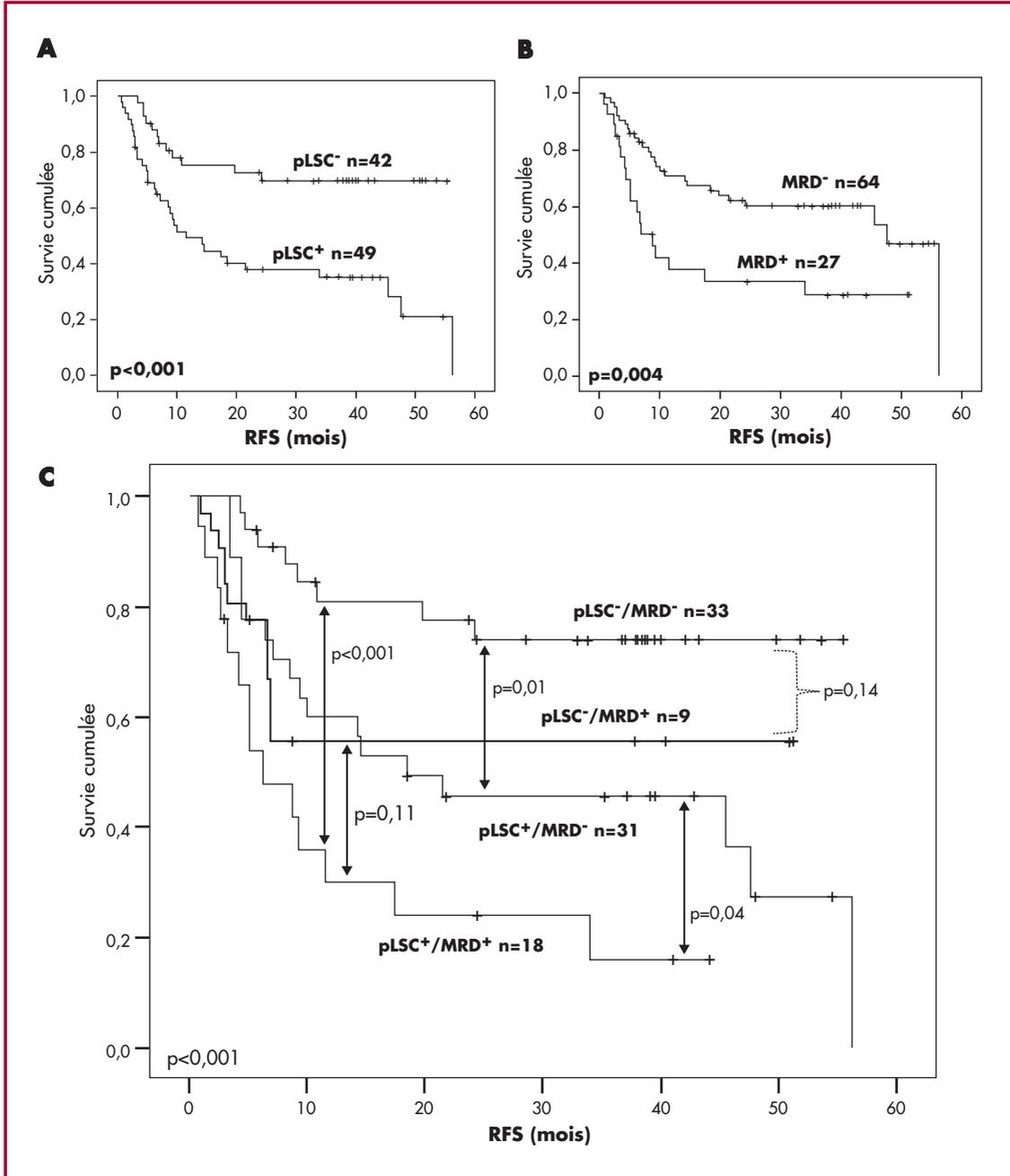
Tableau 1

Exemple de panel d'AC minimal de suivi de la MRD en CMF multiparamétrique conforme aux recommandations de l'ELN (en grisé : squelette commun de fenêtrage des blastes leucémiques) actuellement utilisé pour le suivi de la MRD des patients LAM des essais du BIG (approche conjointe LAIP/DifN et LSC).

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8
T 1	CD7/56	CD13	CD33	CD34	CD38	CD117	CD19	CD45
T 2	CD90	MIX* TIM3+CLL1+CD97	CD123	CD34	CD38	CD117	CD45RA	CD45
T3	CD36	CD11b	CD33	CD34	HLADR	CD117	CD4	CD45



FIGURE 4



Apport de l'étude, au côté de la MRD en CMF LAIP/DifN, de l'étude des cellules souches leucémiques : impact sur la survie sans rechute : **A)** approche LSC, **B)** approche MRd LAIP/DifN, **C)** approche couplée MRD+LSC (Terwijn, 2014 [25]).

- évaluation en fin de consolidation, afin d'envisager un traitement d'entretien,
- détection précoce des rechutes, par un suivi rapproché permettant d'initier rapidement la recherche de donneur en vue d'une allogreffe ou d'envisager une autre thérapie,
- avant allogreffe de CSH,

- après allogreffe de CSH, afin de moduler l'immunosuppression ou d'envisager des injections de lymphocytes du donneur (DLI), voire de réaliser un traitement préemptif (azacitidine ?).
- comparer l'efficacité d'un bras de traitement par rapport à un autre.

Application clinique dans les leucémies aiguës myéloïdes

La première application de la MRD dans les LAM est de confirmer ou d'infirmer la rémission complète de manière plus précise que la morphologie. L'ELN 2017 [20] a inclus ce nouveau critère de réponses (rémission complète avec ou sans MRD). Sa seconde application est de prédire, plus ou moins précocement, la rechute. Cette utilisation, pour les marqueurs moléculaires, est actuellement restreinte aux leucémies aiguës promyélocytaires (LAP), aux leucémies à *core binding factor* et aux leucémies *NPM1* mutés. Pour les autres patients, l'ELN recommande la cytométrie de flux. Ce choix peut éventuellement être discuté s'il existe d'autres marqueurs moléculaires et que ceux-ci augmentent au cours du temps alors que le patient demeure en rémission cytologique. Quel que soit le test utilisé ou le moment où celui est réalisé, une MRD positive est toujours significativement associée à la rechute dans les études publiées. Pour autant, elle est rarement utilisée à l'échelle individuelle, d'une part car un résultat positif ne prédit pas systématiquement une rechute (l'inverse est également vrai), et d'autre part parce que les seuils décisionnels, les techniques et les moments clés du traitement où la MRD est réalisée sont très variables d'une étude à l'autre ; une homogénéisation des pratiques au niveau européen, voire international, demeure donc nécessaire.

Cas particuliers

Les leucémies aiguës promyélocytaires

Le point de MRD le plus important est en fin de consolidation. Une PCR négative à ce moment est associée à un risque très faible de rechute, et ceci quel que soit le traitement utilisé : chimiothérapie + ATRA ou ATRA + arsenic (ASO) [26-28]. Si, durant les phases de traitement, la MRD n'a pas de valeur pronostique, il n'en va pas de même après l'arrêt du traitement. En effet, la conversion d'une PCR négative en une PCR positive confirmée prédit une rechute à plus ou moins court terme. Pour les patients traités par ATRA + ASO, il est recommandé de réaliser un suivi sur moelle jusqu'à obtention d'une MRD négative et jusqu'à la fin du traitement – ceci pour les LAP de risque faible et intermédiaire. Pour les patients de haut risque, le suivi sera prolongé deux ans après l'arrêt du traitement sur le sang et la moelle tous les trimestres.

Les leucémies aiguës myéloïdes à translocation [8;21]/ RUNX1-RUNX1T1

Le taux de transcrite initial n'a pas d'impact sur la rechute ni sur la survie. Durant la phase de traitement, il n'existe pas de consensus sur le type de prélèvement à utiliser (sang *versus* moelle), ni sur le moment auquel la MRD doit être réalisée (fin induction, après une ou deux cures de consolidation). Dans tous les cas, une MRD négative précoce n'est pas associée à un pronostic favorable. Dans le protocole CBF (pour *core binding factor*) 2006 [29], la non-réduction de 3 log₁₀ par rapport au diagnostic en fin d'induction ou après une cure de consolidation sur la moelle était associée à un risque de rechute plus important, sans que cette étude ait pu montrer l'impact de la greffe chez ces patients. Dans ce sous-groupe de leucémie aiguë, ce qui fait consensus est que la persistance d'une MRD positive sur sang et non sur moelle en fin de traitement est associée à un risque de rechute très élevé (90 %), de même que la conversion d'une MRD négative en MRD positive confirmée sur



sang après la fin de traitement, sans qu'il y ait à ce jour de recommandations de traitement chez ces patients [19].

Les leucémies aiguës myéloïdes avec inversion 16/CBF β -MYH11

Comme pour les translocations [8;21], le taux de transcrit initial ou une MRD négative précoce n'ont pas de valeur pronostique [30]. Dans le protocole CBF 2006 [29], 3 log₁₀ de réduction en fin d'induction ou après une cure de consolidation était associée à un taux de rechute significativement plus élevé. Il n'existe aucune donnée dans la littérature, à notre connaissance, concernant la fin du traitement ou la période qui suit.

Les leucémies aiguës myéloïdes à NPM1 mutées

De nombreux articles ont démontré la valeur prédictive d'une MRD négative sur l'incidence de rechute ou la survie. Néanmoins, faute d'homogénéisation dans l'expression des résultats ou du moment où est réalisée la MRD, il était difficile jusque récemment de formuler des recommandations. Deux papiers récents [17, 18] ont permis de faire évoluer les choses. Dans ces études, bien que la sensibilité soit meilleure dans la moelle que le sang (0,5 à 1 log₁₀ de différence), ce que confirme la majorité des études, le sang est plus prédictif que la moelle. Un autre point commun à ces deux études est qu'une MRD négative [17] ou une perte de 4 log₁₈ après deux cures de chimiothérapie y est associée à un très faible risque de rechute, quel que soit le statut FLT3ITD. Dans la seconde étude, Balsat *et al.* [18] ont par ailleurs montré l'absence de bénéfice de l'allogreffe chez les patients NPM1⁺ FLT3ITD⁺ ayant perdu 4 log₁₀. À noter, toutefois, que le recul médian n'était pas très important. À notre connaissance, il s'agit de la première application en pratique clinique, puisque c'est cette stratégie qui est désormais appliquée dans le protocole BIG1.

Autres cas

D'une manière générale, L'ELN recommande une approche par cytométrie de flux. Or, la communauté hématologique française a, dans son ensemble, pris du retard dans ce domaine – retard qu'elle essaie actuellement de combler, notamment via la mise en place de plusieurs groupes de travail, lesquels ont émis un certain nombre de recommandations [9, 31]. De la même façon que la biologie moléculaire, une MRD négative sur la moelle et après deux cures de chimiothérapie est associée à un meilleur pronostic.

Pour les patients ayant un marqueur moléculaire, un suivi moléculaire sur moelle et sang est également recommandé après deux cures de chimiothérapie et en fin de traitement. À noter qu'il n'existe que peu de kits permettant ce suivi, ce qui rend difficile la standardisation des résultats. À titre personnel, pour les patients ayant un transcrit de fusion, je préconise plutôt la ddPCR avec une oligocentralisation des prélèvements.

Une autre possibilité est de réaliser un suivi des mutations par NGS. Plusieurs articles [12, 13] en ont démontré la faisabilité, avec quelques restrictions : le problème des mutations liées à l'âge (DNMT3A, TET2 et ASXL1) [15, 16], la prise d'essai en ADN, le problème du bruit de fond limitant la sensibilité de 0,1 % à 1 %, ainsi que le coût très élevé, en particulier pour une analyse prospective en vie réelle. Sur les hot-spots tels que IDH1/2, FLT3TKD, N ou K-RAS, la ddPCR a des avantages indiscutables, mais elle est difficilement envisageable sur les autres cibles de manière prospective.

Le dernier marqueur utilisable est la quantification de l'expression de WT1. Si ce marqueur a été très à la mode à la fin des années 2000, il est aujourd'hui très contesté, pour trois raisons majeures : son manque de sensibilité, son utilisation limitée à environ 50 à 60 % des patients et sa non-spécificité aux LAM. Néanmoins,

il présente plusieurs intérêts majeurs : il est réalisé sur le sang, le coût de sa quantification est faible par rapport au NGS et la prédiction de rechute qu'il permet est identique à celle de la CMF ou du NGS [32] (la *figure 5* compare les trois approches).

Eh oui, il existe encore des effets de modes même dans notre discipline.

Ce sous-groupe de patients sans marqueurs moléculaires, classiquement suivables par RQPCR, se compose donc de patients de pronostic intermédiaire ou défavorable ; ils ont donc des indications d'allogreffe. La MRD, pourrait, en fonction de son niveau, avoir un impact sur le choix du type de donneur, de la même façon que chez les patients qui ne sont pas en RC hématologique. Il serait également possible, en théorie, d'envisager de ne pas réaliser de greffe chez les patients très bon répondeurs, mais cela suppose de disposer de techniques de mesure d'une grande sensibilité, ce que ni la CMF, ni le NGS ni le suivi de WT1 ne sont aujourd'hui.

Maladie résiduelle en prétransplantation

Que ce soit par CMF, *via* le suivi de WT1 ou, plus récemment, par NGS, une MRD prétransplantation positive est un facteur pronostique indépendant de rechute et de moins bonne survie post-transplantation [33, 34]. Malheureusement, une étude récente [35] a démontré que la conversion d'une MRD prégreffe positive en MRD postgreffe négative n'avait pas d'impact sur le taux de rechute ou la survie après une greffe myéloablatrice.

Il a aussi été montré que la détection, avant allogreffe, de CSL en CMF avait un impact sur la survie sans rechute [25].

FIGURE 5

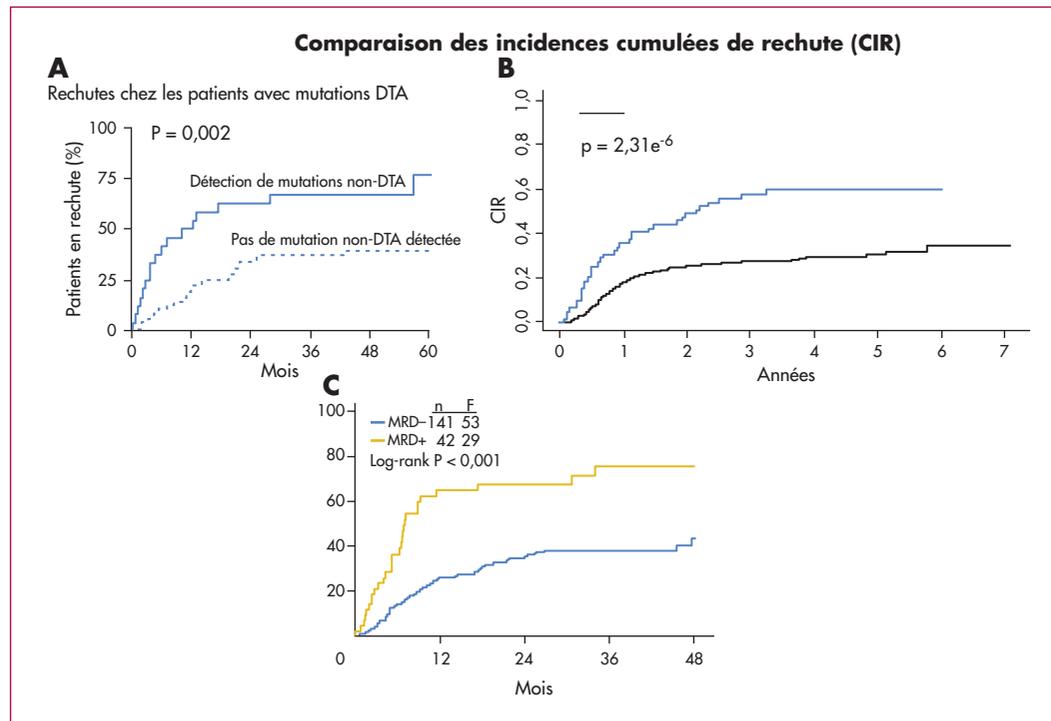


Illustration comparant les incidences cumulées de rechutes (CIR) en fonction de la technique utilisée. **A)** Technique NGS, Jongen-Lavrencic *et al.*, [12]. **B)** WT1 et RQ PCR, Lambert *et al.*, [32]. **C)** Cytométrie en flux, Terwijn *et al.*, [36].



En conclusion, en cas de MRD positive avant greffe, c'est-à-dire de maladie plus agressive, la greffe donne de moins bons résultats !

Maladie résiduelle post-transplantation

Très peu de données ont été publiées à ce jour, que ce soit par CMF ou par NGS. La majorité des articles concernent l'impact du chimérisme sur la rechute et la survie. Nous ne les détaillerons pas, car le chimérisme, qui représente le ratio entre cellules du donneur et receveur, ne mesure pas la maladie résiduelle [36, 37] – même si on peut penser qu'une augmentation, avec le temps, du taux de cellules du receveur correspond le plus souvent (mais pas toujours) à une amplification des cellules tumorales.

Dulery *et al.* [38], ont également publié l'impact de la MRD suivi sur WT1. Les patients présentant un taux de WT1 supérieur à 0,5 % sur le sang, à J100 postallogreffe, ont 85 % de rechute à deux ans post-allogreffe – quand ce risque n'est que de 15 % si ce taux est inférieur à 0,5 %, et de 45 % et 30 %, respectivement, si le chimérisme est mixte ou de type donneur. De même, il a été montré que la caractérisation de CSL en CMF postallogreffe avait un impact négatif sur la survie [39].

Comparer l'efficacité d'un bras de traitement par rapport à un autre ou l'efficacité de nouvelles drogues

Étonnamment, ce sont deux études françaises qui ont utilisé la MRD dans ce but. La première étude concernait les CBF [40], et celle-ci a démontré que le bras contenant de hautes doses de daunorubicine donnait de meilleurs résultats en termes de réponse clinique, et que les taux de MRD y étaient associés. La seconde étude concernait le protocole ALFA 0701 [41]. Cette étude a démontré le bénéfice de l'ajout du gemtuzumab ozogamicine (Mylotarg[®]), en doses fractionnées, à la chimiothérapie, cet avantage se traduisant, comme dans la première étude, par une MRD plus faible chez les patients *NPM1* muté ayant reçu le Mylotarg[®].

En conclusion

Dans les LAM, la MRD est un marqueur pronostic fort et ce quels que soient la technique employée, le matériel biologique utilisé ou le moment où elle est réalisée. De gros efforts d'harmonisation entre les différentes équipes sont toutefois encore nécessaires afin d'en faire un *surrogate marker*.]

Remerciements : Aux docteurs Adrianna Plesa, Forent Dumézy et Christophe Roumier
Aux patients et participants des groupes ALFA et ELAM02, pour avoir accepté de soutenir cette thématique depuis de nombreuses années
Aux membres MRD de L'ELN

Références

- [1] Donhner 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] Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: consensus document from ELN MRD Working Party. *Blood* 2018 ; 131 (12) : 1275-91.
- [10] Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia* 2018 ; 32 (2) : 273-84. doi: [10.1038/leu.2017.213](https://doi.org/10.1038/leu.2017.213).
- [11] 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. doi: [10.3324/haematol.2017.183525](https://doi.org/10.3324/haematol.2017.183525).
- [12] 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. doi: [10.1056/NEJMoa1716863](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716863).
- [13] 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. doi: [10.1182/blood-2018-02-829911](https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-829911).
- [14] Debarri H, Lebon D, Roumier C, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget* 2015 ; 6 (39) : 42345-53. doi: [10.18632/oncotarget.5645](https://doi.org/10.18632/oncotarget.5645).
- [15] Genovese G, Kaehler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014 ; 371 (26) : 2477-87.
- [16] Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014 ; 371 (26) : 2488-98.
- [17] Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al., UK National Cancer Research Institute AML Working Group. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N Engl J Med* 2016 ; 374 (5) : 422-33.
- [18] 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.
- [19] Willekens C, Blanchet O, Renneville A, et al., French AML Intergroup. 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.
- [20] Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017 ; 129 (4) : 424-47.
- [21] Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2011 ; 153 (4) : 421-36.
- [22] San Miguel JF, Martínez A, Macedo A, et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997 ; 90 (6) : 2465-70.
- [23] Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, et al. FlowSOM: using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A* 2015 ; 87 (7) : 636-45.
- [24] van der Maaten L, Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res* 2008 ; 9 : 2579-605.
- [25] 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.
- [26] Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK. Can we say farewell to monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukaemia? *Best Pract Res Clin Haematol* 2014 ; 27 (1) : 53-61.
- [27] Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct preemptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 (22) : 3650-8.
- [28] Platzbecker U, Avvisati G, Cicconi L, et al. Improved outcomes with retinoic acid and arsenic trioxide compared with retinoic acid and chemotherapy in non-high-risk acute promyelocytic leukemia: final results of the randomized Italian-German APL0406 trial. *J Clin Oncol* 2017 ; 35 (6) : 605-12.
- [29] Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease (MRD) in patients with core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Blood* 2013 ; 121 (12) : 2213-23. doi: [10.1182/blood-2012-10-462879](https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-462879).
- [30] Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood* 2012 ; 120 (14) : 2826-35.
- [31] Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol* 2013 ; 31 (31) : 3889-97.
- [32] Lambert J, Lambert J, Thomas X, et al. Early detection of WT1 minimal RESIDUAL disease predicts outcome in acute myeloid leukemia and identify patients with high risk of relapse independently of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2017 ; 130 (Supplement 1).
- [33] Buckley SA, Wood BL, Othus M, et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Haematologica* 2017 ; 102 (5) : 865-73.
- [34] Araki D, Wood BL, Othus M, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia: time to move toward a minimal residual disease-based definition of complete remission? *J Clin Oncol* 2016 ; 34 (4) : 329-36.
- [35] Zhou Y, Othus M, Araki D, et al. Pre- and posttransplant quantification of measurable ('minimal') residual disease via multiparameter flow cytometry in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016 ; 30 (7) : 1456-64.
- [36] Alizadeh M, Bernard M, Danic B, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002 ; 99 (12) : 4618-25.
- [37] Maas F, Schaap N, Kolen S, et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003 ; 17 (3) : 621-9.
- [38] Duléry R, Nibourel O, Gauthier J, et al. Impact of Wilms' tumor 1 expression on outcome of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for AML. *Bone Marrow Transplant* 2017 ; 52 (4) : 539-43. doi: [10.1038/bmt.2016.318](https://doi.org/10.1038/bmt.2016.318).



[39] Bradbury C, Houlton AE, Akiki S, *et al.* Prognostic value of monitoring a candidate immunophenotypic leukemic stem/progenitor cell population in patients allografted for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2015 ; 29 (4) : 988-91.

[40] Prebet T, Bertoli S, Delaunay J, *et al.* Anthracycline dose intensification improves molecular response and outcome of patients treated for core binding factor acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2014 ; 99 (10) : e185-7.

[41] Lambert J, Lambert J, Nibourel O, *et al.* MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicine. *Oncotarget* 2014 ; 5 (15) : 6280-8.