ACNBH

Agrément FMC
N 100 168

Méthodes de suivi de la maladie résiduelle dans les hémopathies malignes

41ème Colloque National des Biologistes des Hôpitaux
Toulouse, 24-28 septembre 2012

Edouard Cornet
CHU Caen
Laboratoire d'Hématologie

ACNBH

Agrément FMC
N 100 168

41ème Colloque National
des Biologistes des Hôpitaux
Toulouse, 24-28 septembre 2012

DECLARATION D'INTERET
DANS LE CADRE DE MISSIONS DE FORMATION
REALISEES POUR L'ACNBH

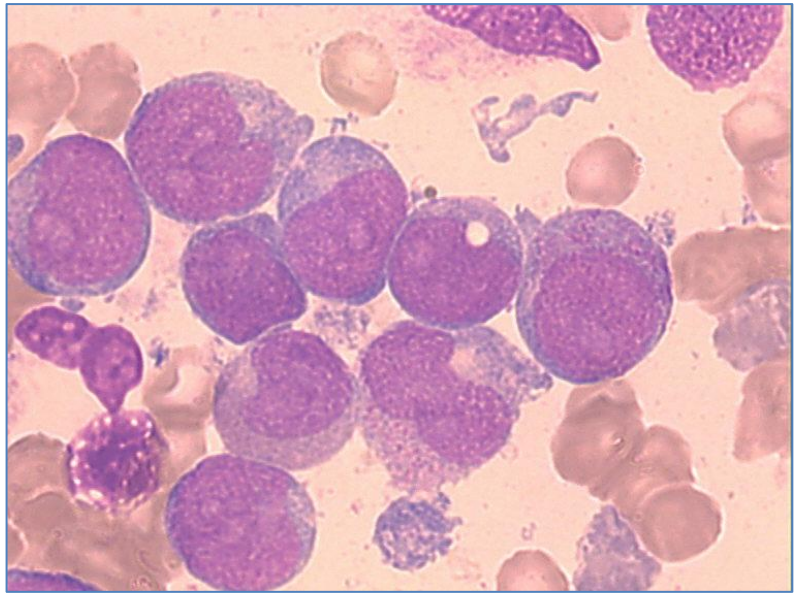
Dr. CORNET Edouard
Exerçant au CHU de Caen
déclare sur l'honneur

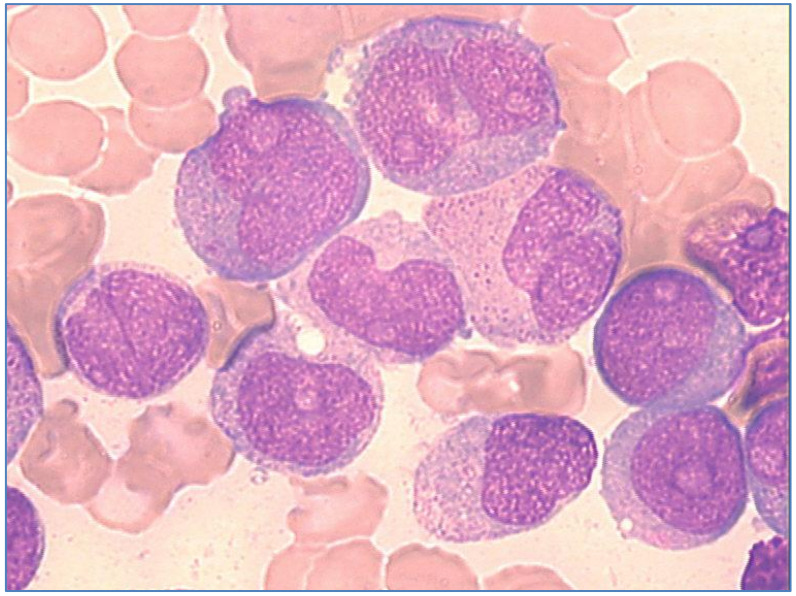
ne pas avoir d'intérêt, direct ou indirect (financier) avec les entreprises pharmaceutiques, du diagnostic ou d'éditions
en relation avec le DMDIV et/ou le sujet présenté.

Introduction

Au diagnostic d'une leucémie: 10^{11} à 10^{12} cellules leucémiques

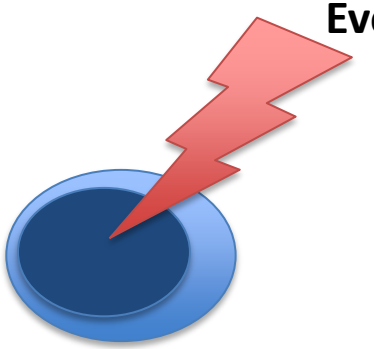
Mise en évidence par cytologie (sang – moelle)

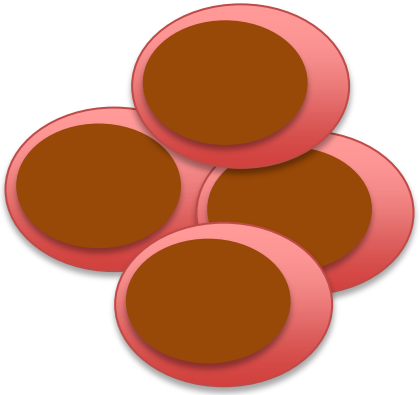




Pathologies clonales

Evénement(s) oncogénique(s)





Modification(s) génomique(s)

Mutations
Translocations chromosomiques

Modification(s) phénotypique(s)

Protéines nucléaires
Protéines cytoplasmiques
Protéines membranaires

Comportement tumoral

Avantage prolifératif
Perturbation de la maturation
Défaut d'apoptose

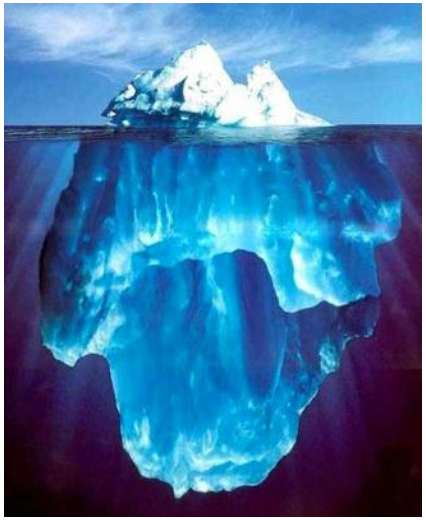
Signature tumorale

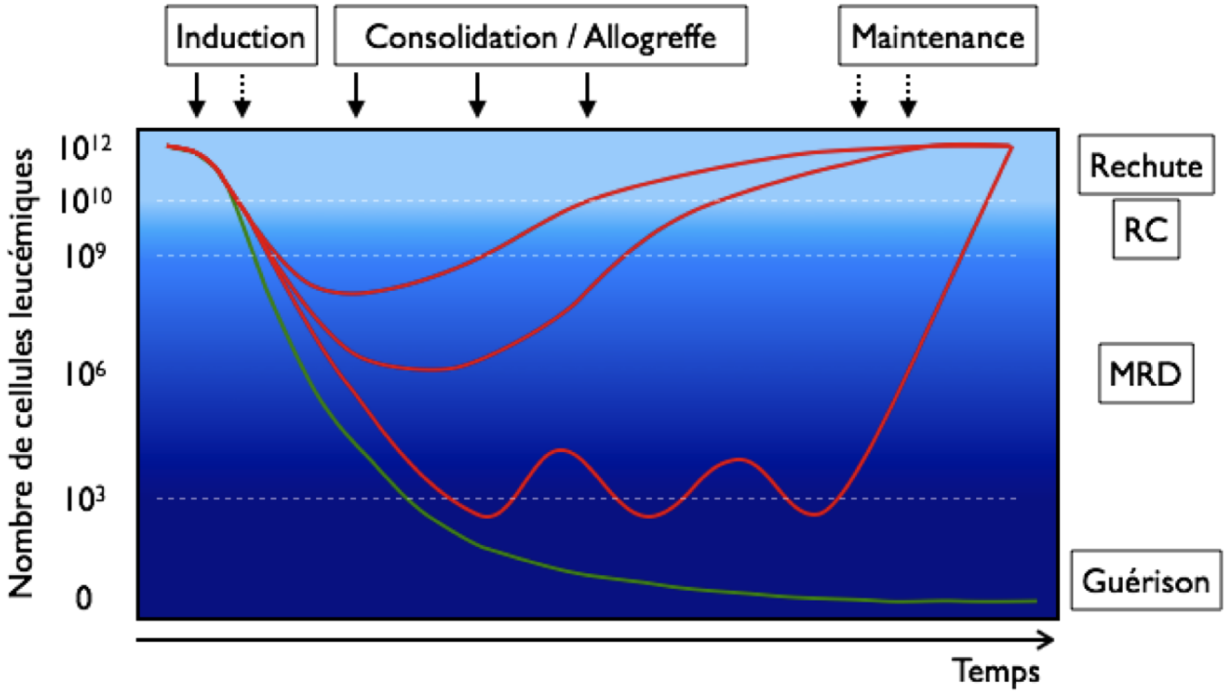
Clone leucémique:

- morphologie *identique*
- marqueurs membranaires *identiques*
- anomalies génétiques *identiques*

Signature particulièrement informative si différente de la cellule normale homologue

Evolution de la masse tumorale





Induction: rémission complète (RC) objectivée par les méthodes conventionnelles (cytologie sang et moelle) dès une réduction d'au moins 2 log

Lorsque le patient est en RC, il peut persister jusque 10^9 à 10^{10} cellules tumorales !!!

Concept de maladie résiduelle

Objectif du traitement: **éradiquer** le clone tumoral

Comment *évaluer son efficacité*?

Suivi la décroissance de la masse tumorale

Problématique: techniques cytologiques peu sensibles

Nécessité de développer des techniques beaucoup plus sensibles

→ Minimal Residual Disease = MRD

Concept de maladie résiduelle

La maladie résiduelle (MRD) est définie par la persistance dans le tissu examiné de cellules malignes **en dessous du seuil de détection** par les techniques conventionnelles, au terme d'une séquence thérapeutique à visée **éradicatrice**

Objectifs de l'étude de la MRD:

1. Evaluer individuellement l'efficacité, la réponse au traitement
2. Prévoir précocement le risque de rechute
3. Adapter la thérapeutique: intensification (traitement à la carte)

Conditions

Marqueur tumoral utilisé

- Fréquent
- Spécifique de la tumeur (plutôt que spécifique du patient)
- Stabilité dans le temps et à la rechute des marqueurs spécifiques de la leucémie, dans le but d'éviter les faux-négatifs au cours du suivi des patients

Conditions techniques

- **Sensibilité** d'au moins 10^{-4}, dépendant de l'application clinique
- **Spécificité**, afin d'éviter les faux-positifs
- **Quantification**, intervalle de mesure large
- **Reproductibilité** inter-laboratoire (essai multicentrique)
- **Standardisation** rigoureuse et contrôles qualité
- Rapidité de rendu des résultats (réactivité clinique)

MRD

Choix du marqueur et de la technique

Marqueurs tumoraux

Anomalies génétiques:

- Mutations de gènes
- Aberrations chromosomiques:
  - Translocations+++
  - Avec ou non expression d'un transcrit de fusion

Anomalies phénotypiques:

- Phénotypes aberrants associés à la tumeur (Leukemia Associated Phenotype)

Techniques possibles

Biologie moléculaire:

- PCR quantitative en temps réel (RQ-PCR)

Cytométrie en flux multiparamétrique

MRD
Quels outils ?

Qualitative MRD:

PCR classique et RT-PCR simple et nichée

Inconvénient majeur: pas d'analyse de la cinétique

Quantitative MRD:

Cytométrie en Flux (CMF)

Semi-quantitative PCR:

Dilution sériée d'un standard

Dilution limite

PCR compétitive

RQ-PCR ARN (ADNc)

RQ-PCR ADN

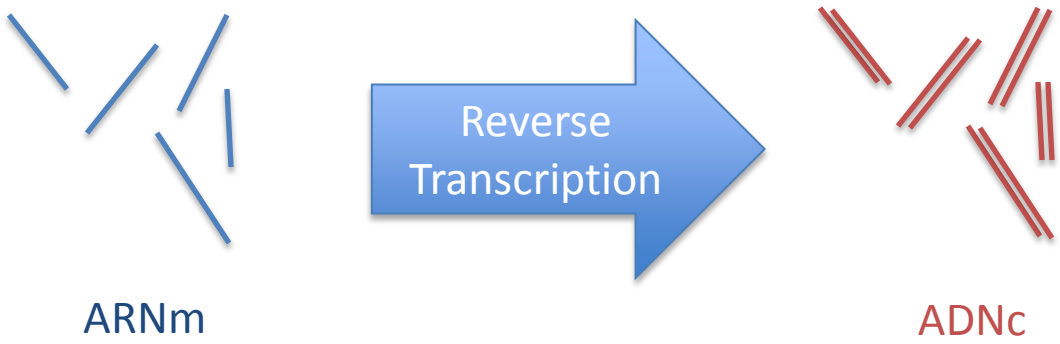
PCR qualitative

RT-PCR: Principes

Matériel : sang ou moelle

Isolement des leucocytes

Extraction de l ’ARN



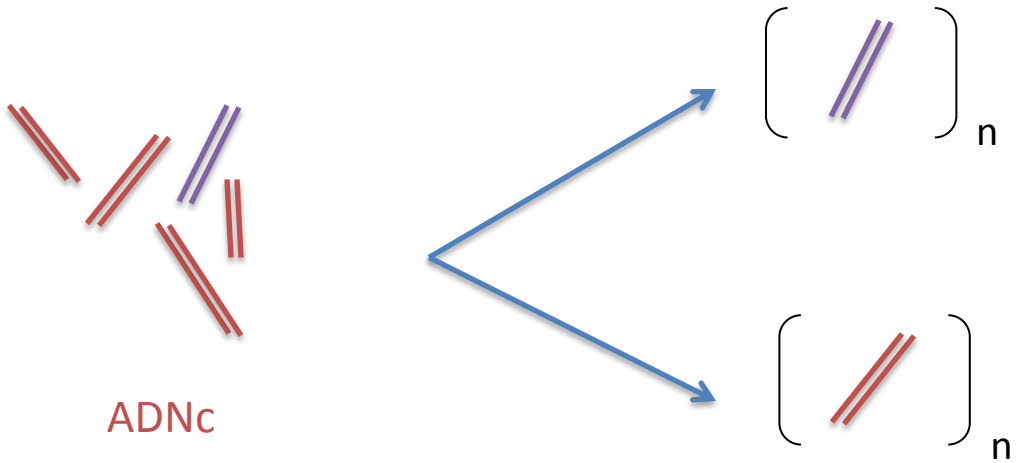
⇒ *Absence d’amplification du matériel génétique*

⇒ *Obtention d’un ADNc double brin plus stable*

PCR qualitative

RT-PCR: Principes

Réaction de PCR:



amorces spécifiques du transcrit pathologique
Exp: BCR-ABL

amorces spécifiques d'un transcrit de référence (contrôle de qualité)
Exp: TBP, ABL, GAPDH, GUS, 18S, PBGD…

⇒ résultat de type pos ou neg
⇒ Sensibilité de 10^{-3} – 10^{-4}
⇒ Sensibilité de 10^{-6} en PCR nichée

PCR qualitative

RT-PCR: Applications

***Avantages* de la RT-PCR (qualitative) :**

Simple

Peu coûteux

***Inconvénients* :**

Absence de quantification réelle => pas de suivi possible

Absence de standardisation

PCR quantitative en temps réel

RQ-PCR: Principes

Principe :

Réaction de PCR libérant de la fluorescence à chaque cycle

=> quantification par mesure de l'intensité de la fluorescence au cours de la réaction de PCR

Matériel :

Sang ou moelle

ADN ou ARN

Si ARN => réaction de reverse transcription (RT) pour obtenir des ADNc plus stables

PCR quantitative en temps réel

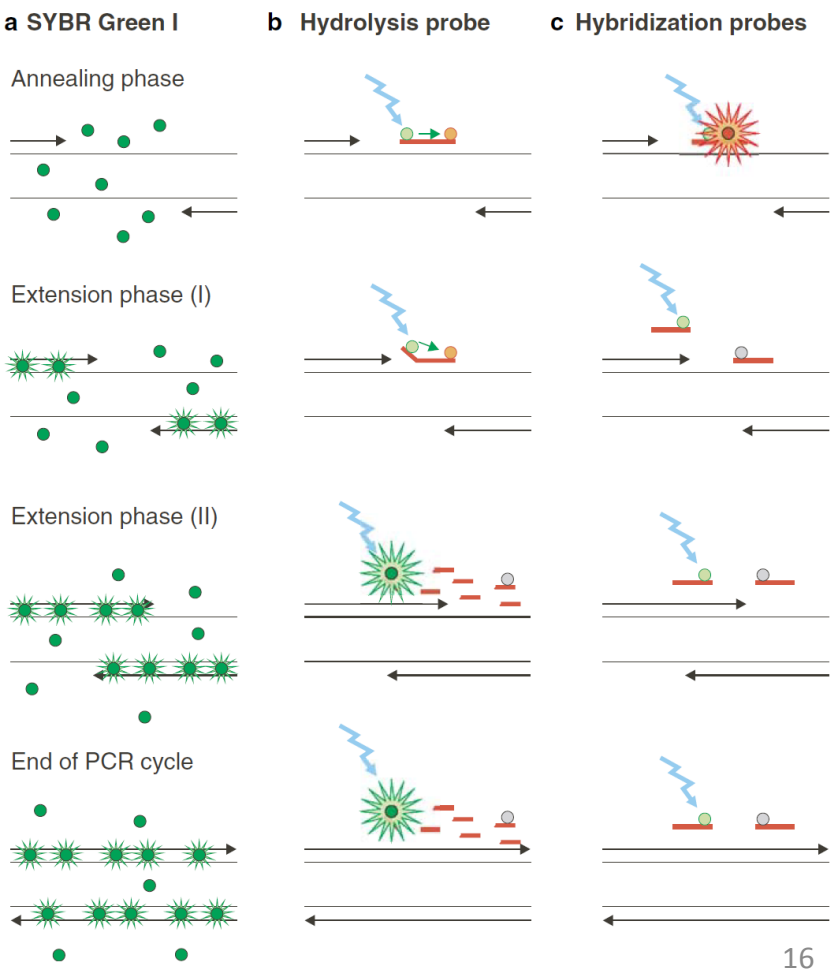
RQ-PCR: Principes

Quantification précise des produits de PCR durant la phase exponentielle d'amplification

Analyse rapide / absence d'analyse post-PCR

<u>Trois techniques principales:</u>

1. SYBR Green I Dye
2. Sonde d'hydrolyse (TaqMan)
3. Sonde d'hybridation



Van der Velden et al. Leukemia 2003

RQ-PCR

Notions importantes

Threshold :

seuil déterminé en début de réaction (3-15 premiers cycles) => background

Cycle threshold (Ct) :

cycle au cours duquel la fluorescence dépasse le seuil

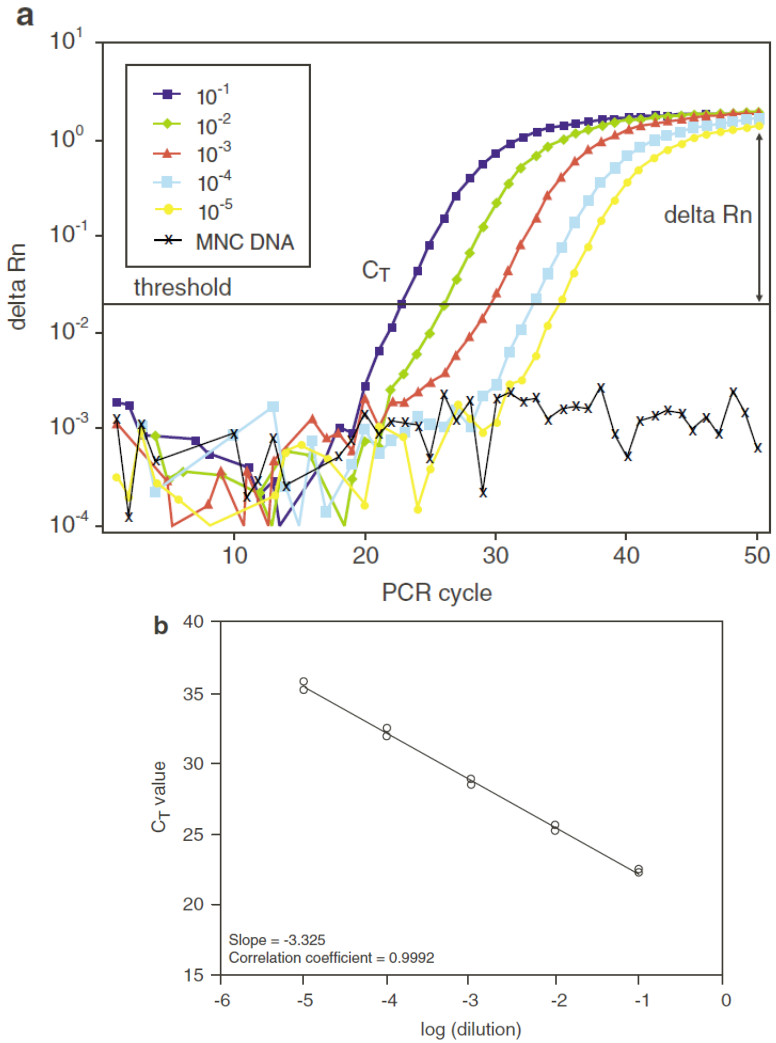
Ct proportionnel à la quantité de séquence cible présente dans l'échantillon

Théorie:

A chaque fois que l'on dilue l'échantillon au ½, le Ct augmente de 1.

⇒ Représentation en échelle logarithmique (^{10}log)

- ⇒ 1 log de différence correspond à une différence de 3,3 Ct
- ⇒ Courbe standard avec une pente de -3,3



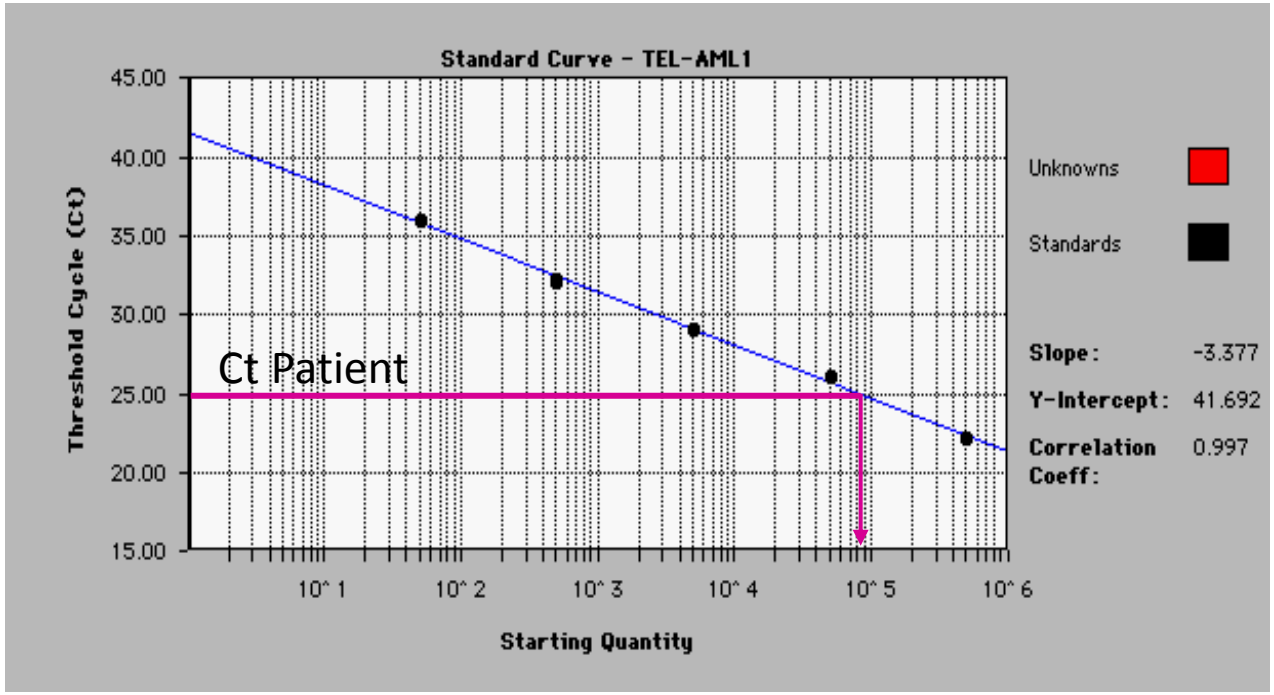
Van der Velden et al. Leukemia 2003

RQ-PCR

Quantification

⇒ Quantification basée sur le Ct

Droite d ’équivalence

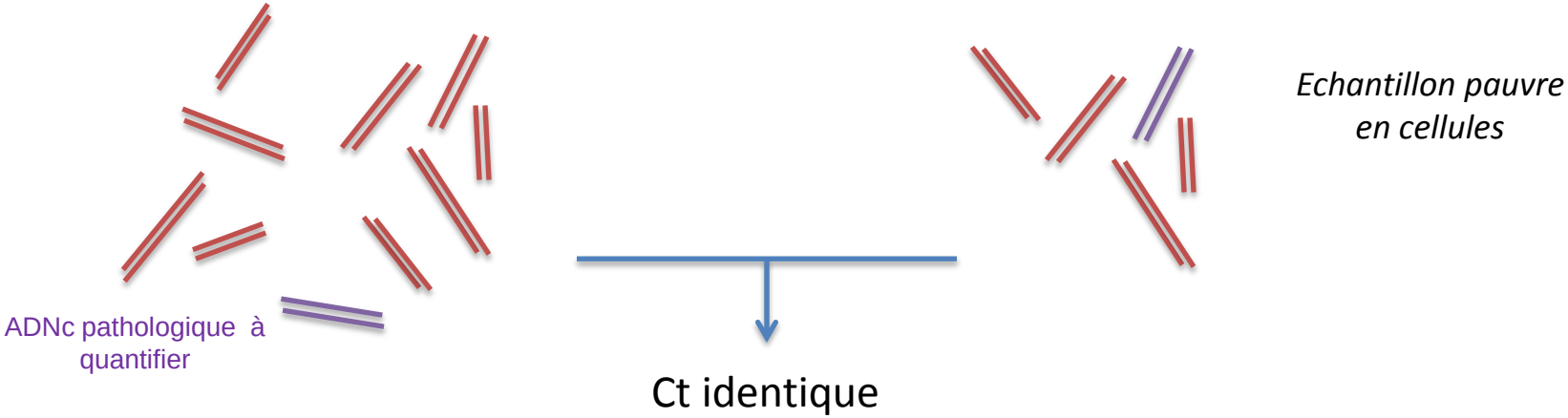


RQ-PCR

Notions importantes

Standardisation des résultats

Problématique: les Ct correspondent à une quantité initiale et non à une concentration (problème de dégradation, de quantité de cellules initiales…)



Solution

Utilisation en parallèle d'une 2ème PCR pour quantifier les ADNc d'un gène ubiquitaire de référence (exp : TBP, ABL…)

= standard interne, révèle la quantité d'ADNc totaux présents dans le milieu

correction du résultat de l'ADNc pathologique à quantifier en fonction du Ct du gène de référence

MRD: cibles utilisables en PCR

1. Réarrangement IGH et/ou TCR
2. Points de cassure lors d'aberrations chromosomiques
3. Transcrit de fusion (aberrations chromosomiques)
4. Gènes mutés
5. Gènes anormalement exprimés

Très spécifique de la cellule tumorale

Absent ou très peu présent dans la cellule normale

Applications variables selon l'hémopathie

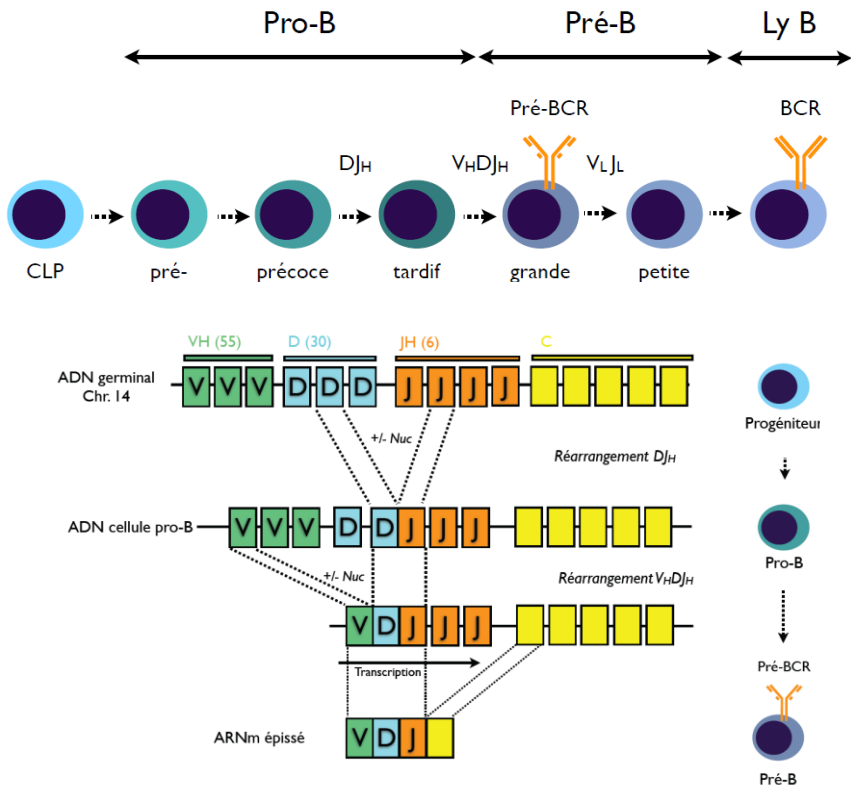
Réarrangement Ig/TCR

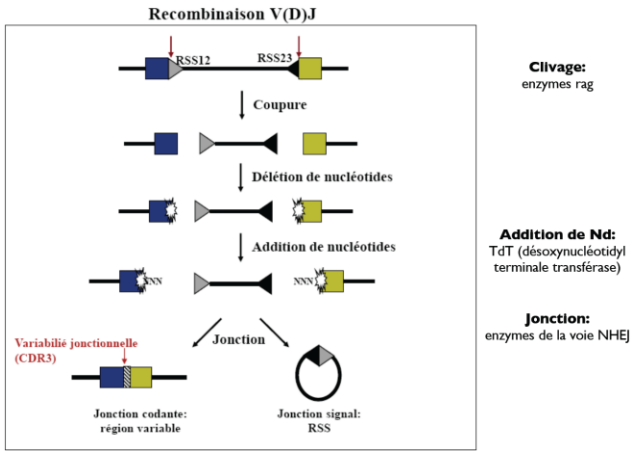
Recombinaison VDJ

Délétion/Insertion de nucléotide pendant le réarrangement

⇒ Signature génomique / Transmissible lors des divisions cellulaires

⇒ 1 Clone leucémique = 1 réarrangement Ig/TCR





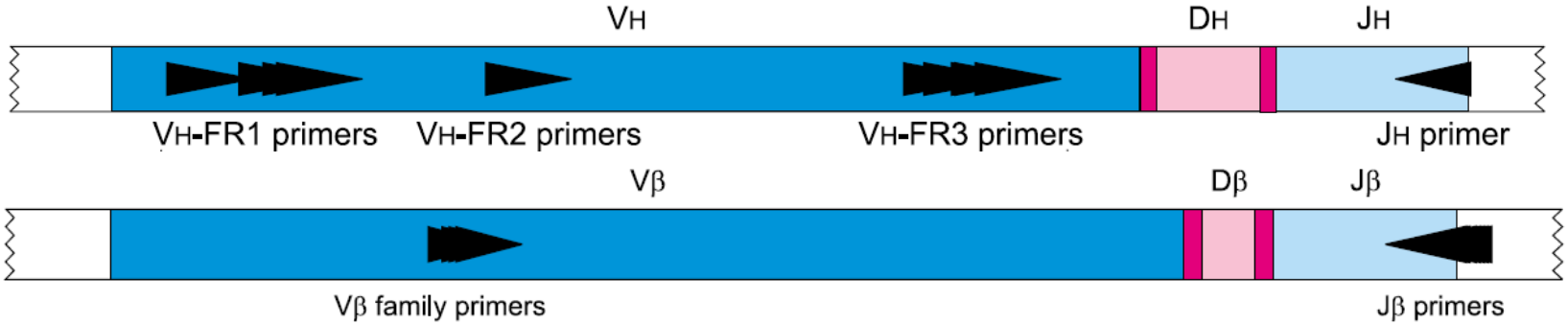
Réarrangements Ig/TCR
Méthodes

PCR semi-quantitative:

PCR encadrant la zone de jonction

PCR quantitative:

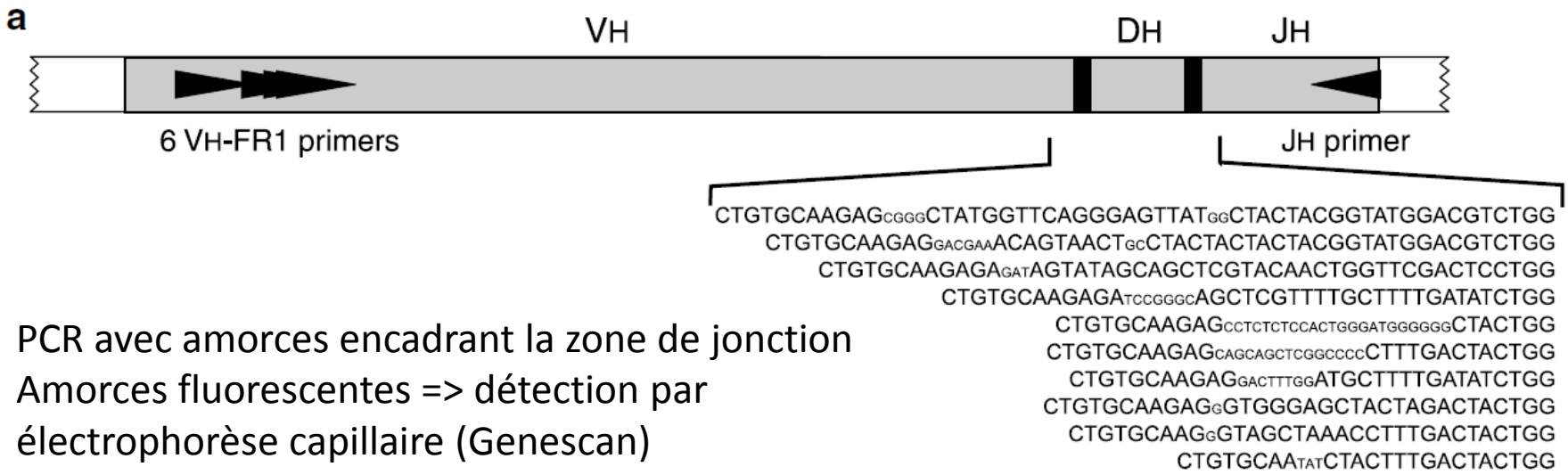
RQ-PCR avec amorces personnalisées



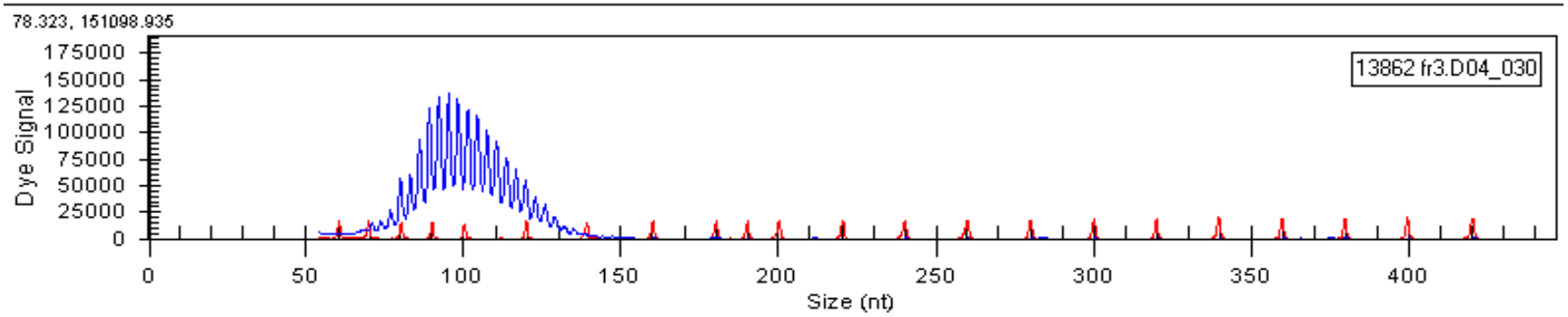
Van Dongen et al. Leukemia 2003

GeneScan

Van Dongen et al. Leukemia 2003



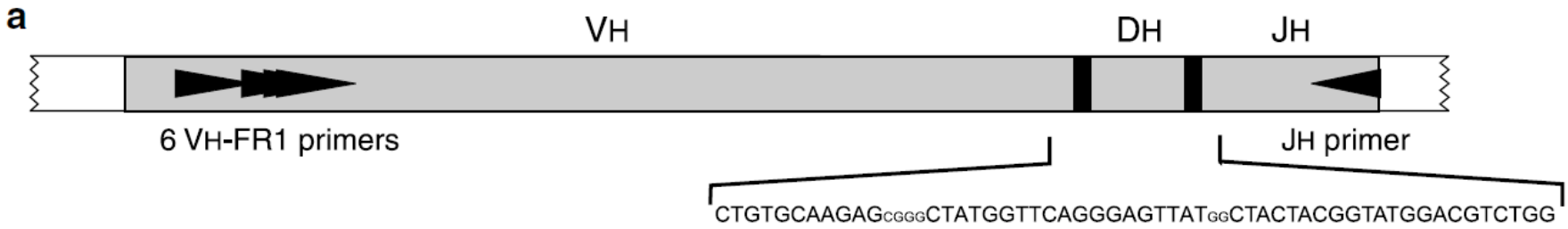
PCR avec amorces encadrant la zone de jonction
Amorces fluorescentes => détection par électrophorèse capillaire (Genescan)



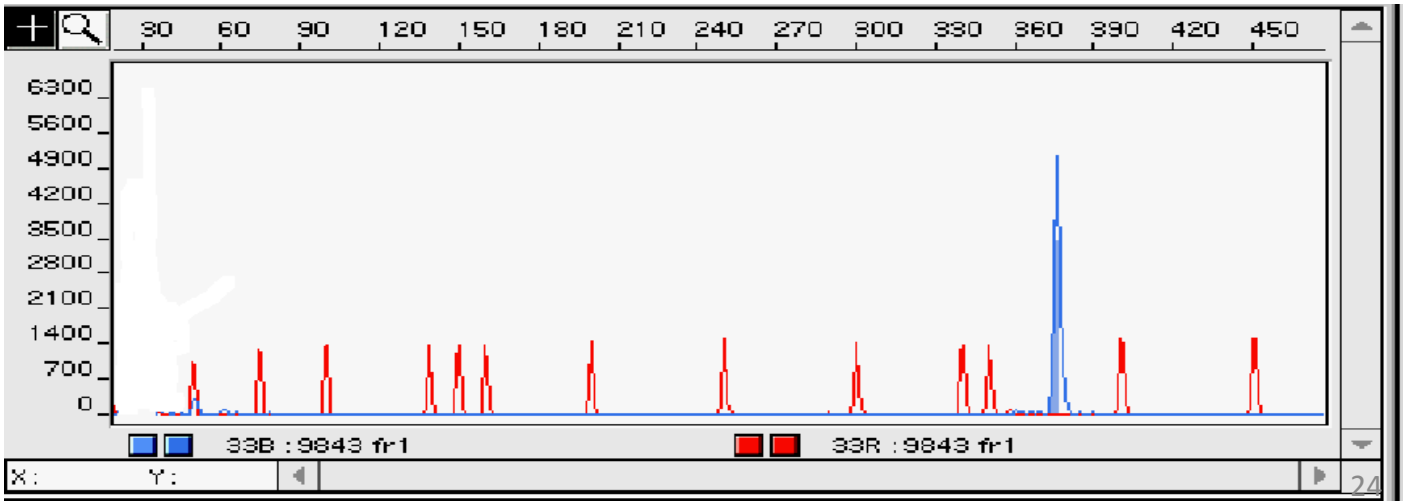
Population polyclonale

GeneScan

Van Dongen et al. Leukemia 2003



Population monoclonale



Réarrangements Ig/TCR

PCR semi-quantitative

Suivi de la MRD par l'intensité du pic monoclonal avec une sensibilité de **10^{-3}**

Applications:

- LAL+++
- Lymphomes

Avantages:

- Bon reflet du pourcentage de cellules
- Informativité dans 90% des LAL
- Utile si absence de remaniement chromosomique

Inconvénients:

- Marqueur instable (évolution clonale / émergence de sous-clone)
- Techniques lourdes (nombreuses réactions de PCR)
- Quantification du transcrit (semi-quantitatif)

Réarrangement Ig/TCR

PCR quantitative

RQ-PCR avec amorces personnalisées

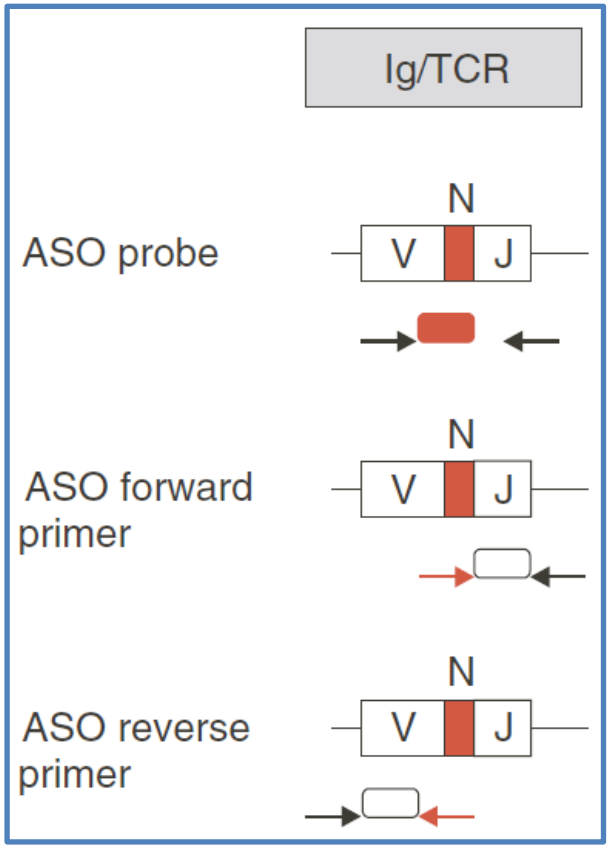
Nécessite un séquençage du réarrangement du clone de départ

Synthèse d'amorce spécifique

Amplification/Quantification spécifique de la zone réarrangée

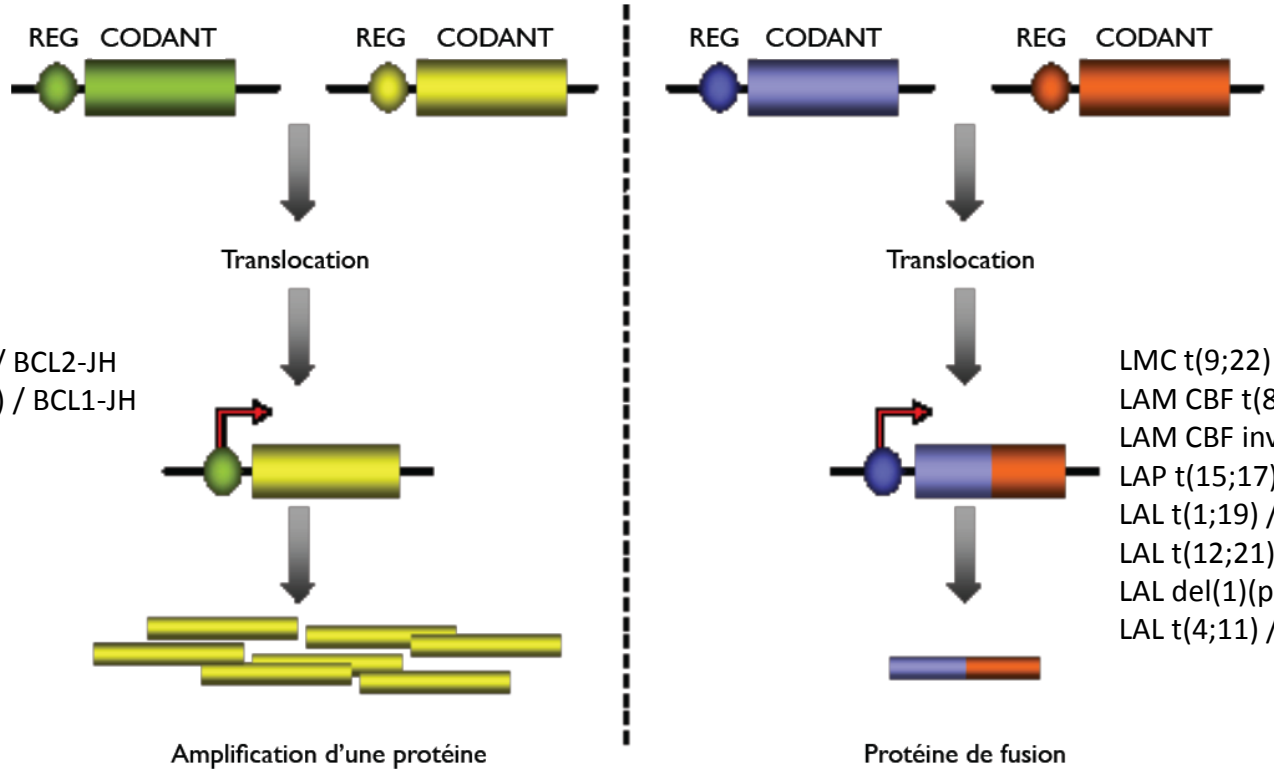
Avantages:

- Plus sensible (10^{-4}) que la PCR semi-quantitative
- Plus spécifique



Van der Velden et al. Leukemia 2003

Aberrations chromosomiques



LNH manteau t(14;18) / BCL2-JH
LNH folliculaire t(11;14) / BCL1-JH

LMC t(9;22) / BCR-ABL
LAM CBF t(8;21) / AML1-ETO
LAM CBF inv(16) / CBFb-MYH11
LAP t(15;17) / PML-RARA
LAL t(1;19) / E2A-PBX1
LAL t(12;21) / TEL-AML1
LAL del(1)(p32;p32) / SIL-TAL1
LAL t(4;11) / MLL-AF4

En fonction du point de cassure, deux réarrangements possibles:

Transcrit de fusion (ARNm chimérique)

Pas de transcrit de fusion (ARNm normal)

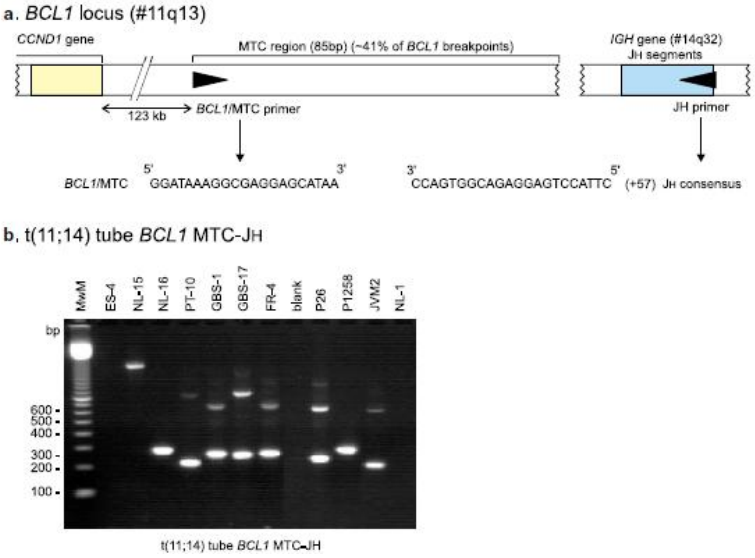
Aberrations chromosomiques

Points de cassure

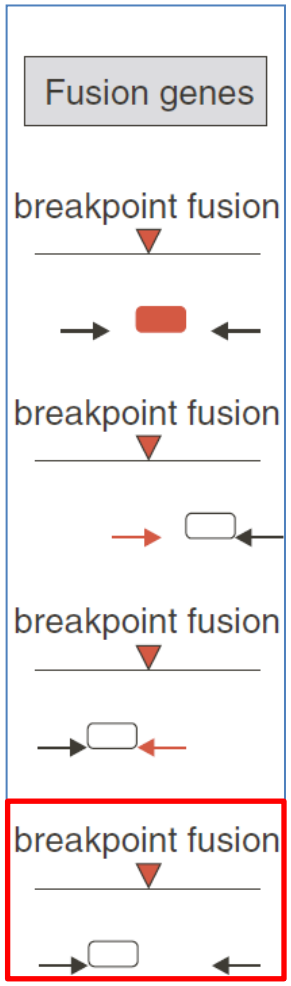
Méthode de **PCR classique** (ADN)

Sensibilité limitée
Utile au diagnostic+++
Peu adaptée au suivi de la MRD

Lymphome du manteau t(11;14)

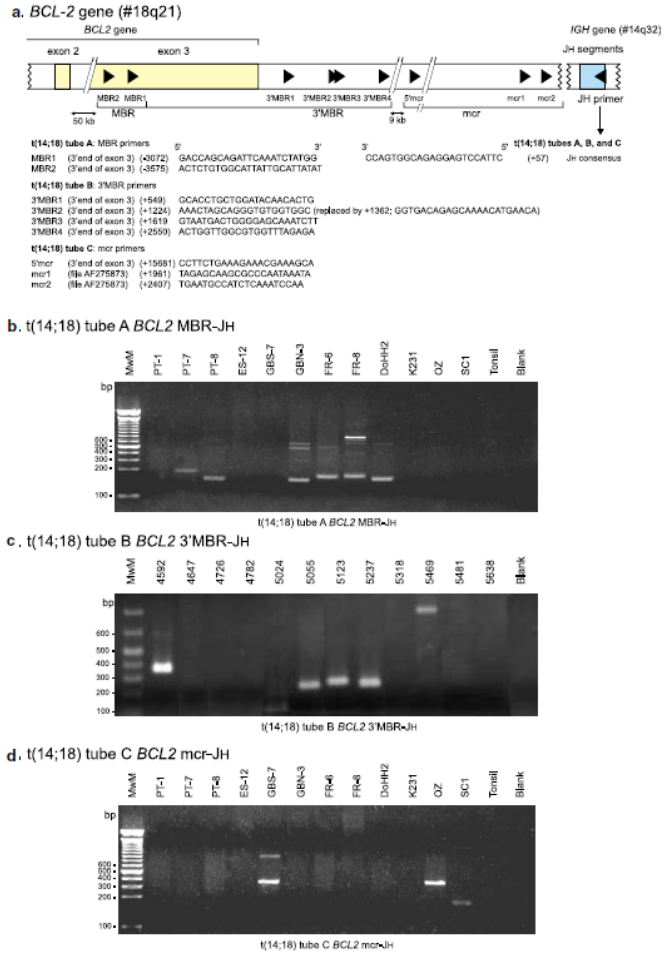


Sensibilité 10^{-3} – 10^{-4}



Van der Velden et al. Leukemia 2003
Van Dongen et al. Leukemia 2003

Lymphome folliculaire t(14;18)



Sensibilité 10^{-2} – 10^{-3}

Aberrations chromosomiques

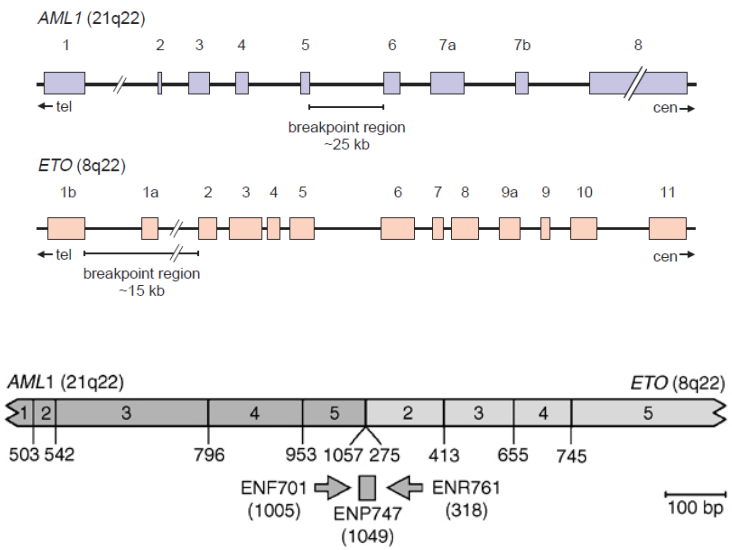
Transcrit de fusion

RQ-PCR (ARN)

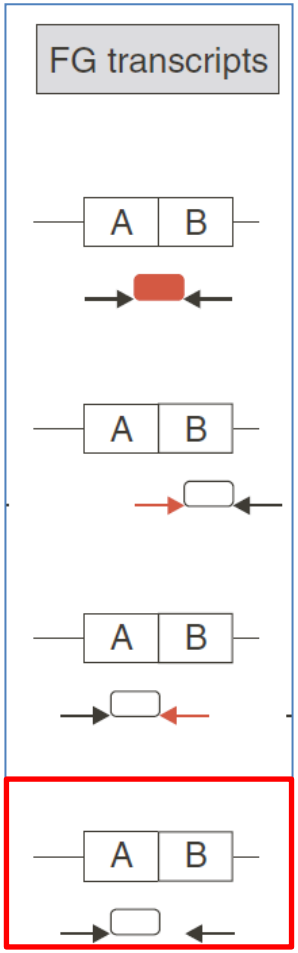
Amorces de chaque côté du point de cassure

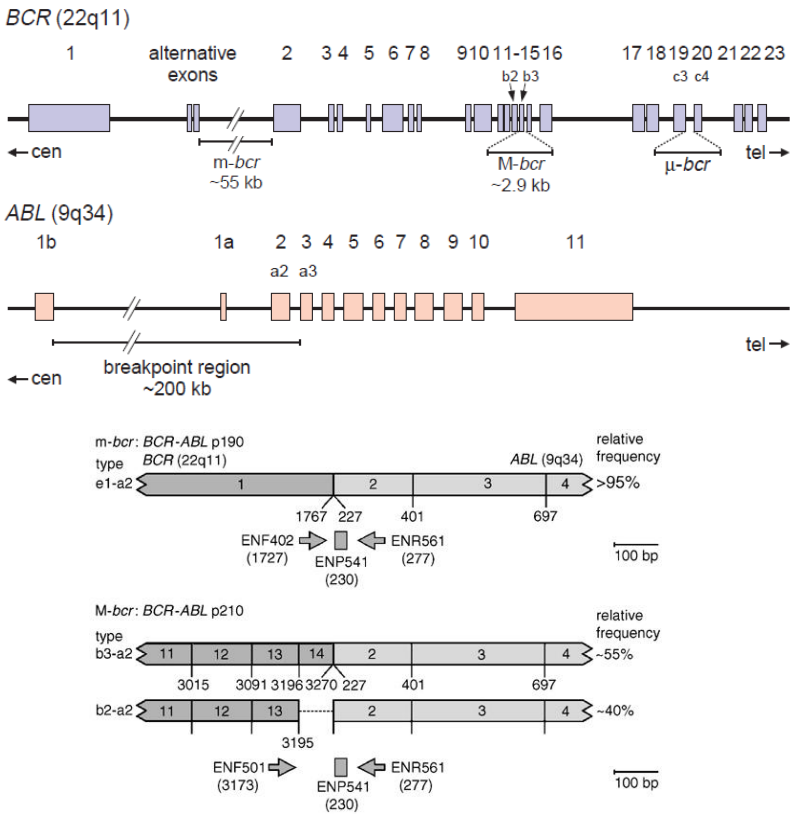
Avantages:

- Spécificité+++
- Stabilité+++



AML1-ETO





BCR-ABL p190 et p210

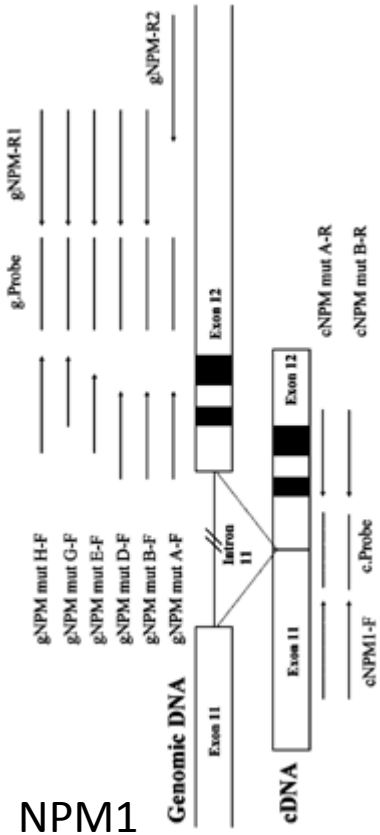
Van der Velden et al. Leukemia 2003
Van Dongen et al. Leukemia 1999
Gabert et al. Leukemia 2003

Gènes mutés

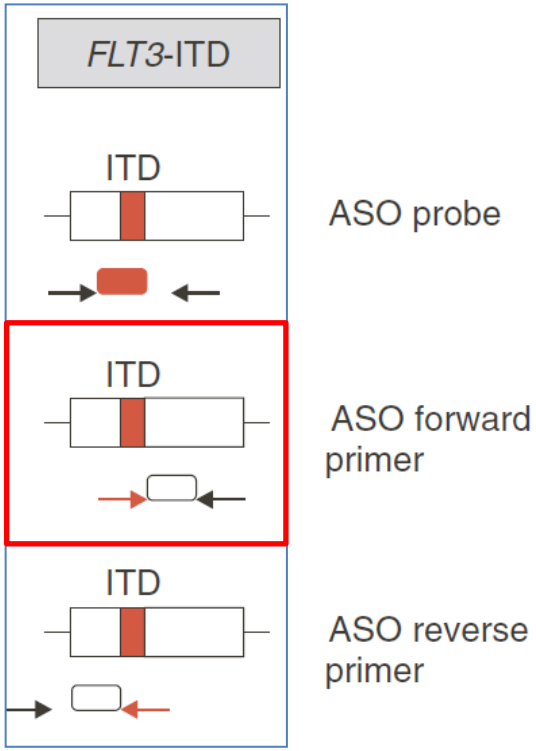
NPM1

FLT3-ITD

Matériel: ADN ou ARN (ADNc)



NPM1

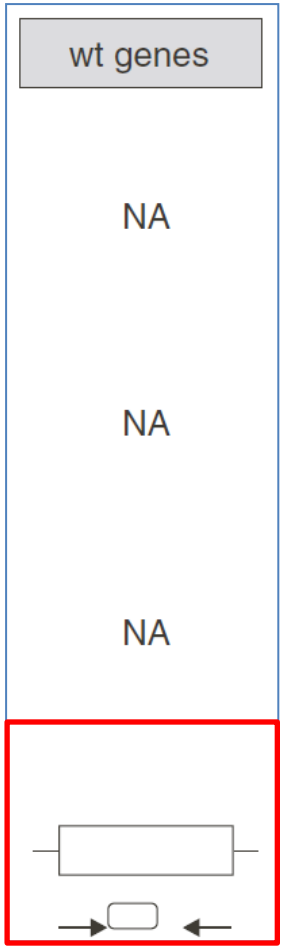


Gènes surexprimés

WT1

EVI1

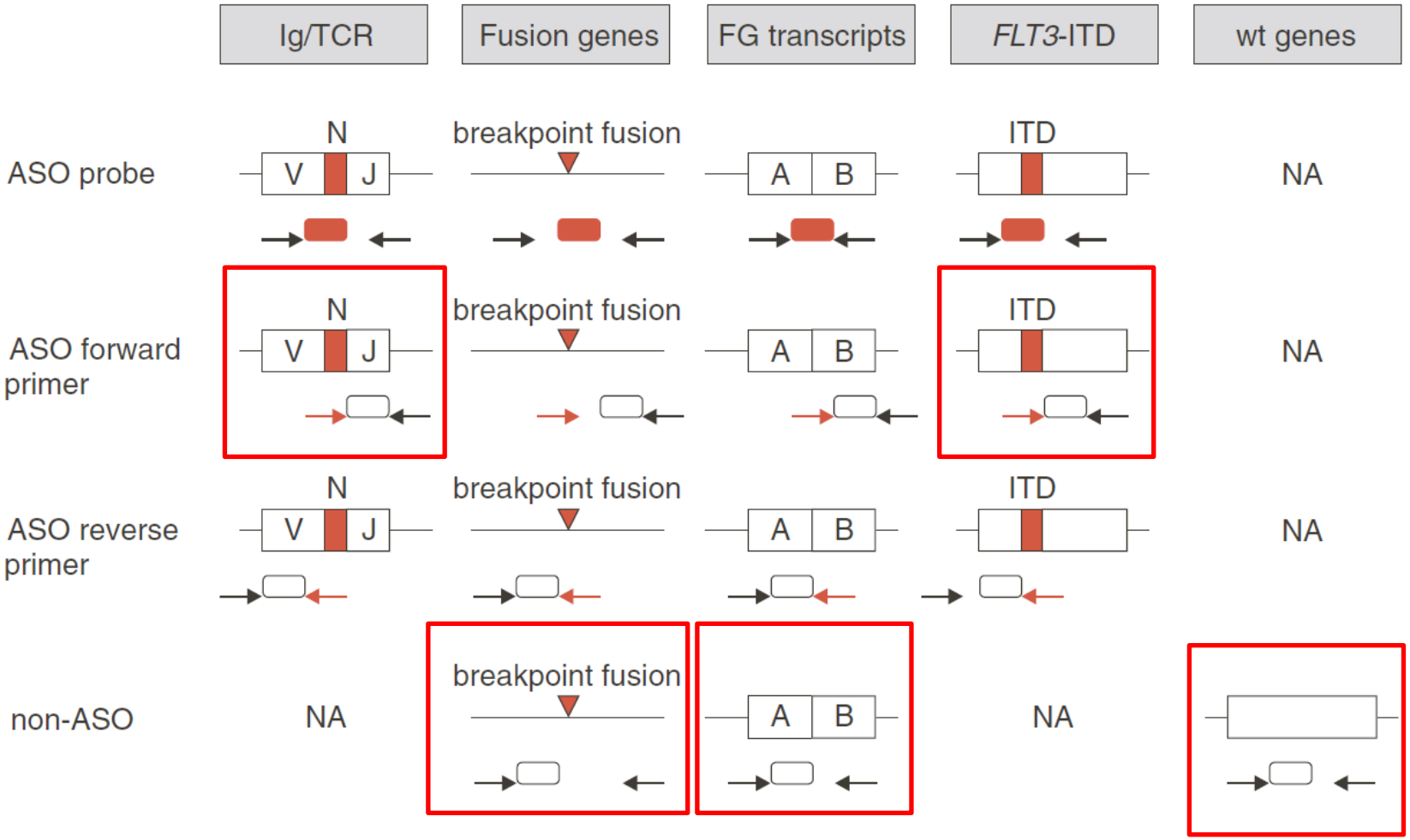
Matériel: ARN (ADNc)



Gorello et al. Leukemia 2006

Van der Velden et al. Leukemia 2003

RQ-PCR: Synthèse



Van der Velden et al. Leukemia 2003

Cytogénétique

Cytogénétique conventionnelle: caryotype

Principe:

Identification et suivi au microscope d'anomalies chromosomiques clonales

Exemples:

Anomalies de nombre:

+8, -7, +12, hyperdiploïdie…

Anomalies de structure:

del(17p), t(9;22), t(3;21), iso(3q), inv(16)…

Cytogénétique

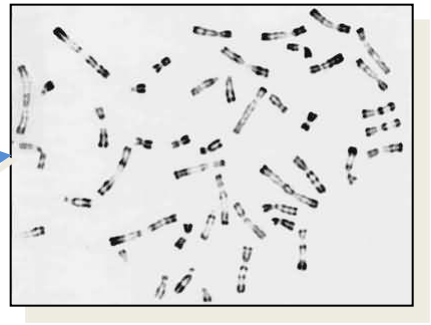
Cytogénétique conventionnelle: caryotype

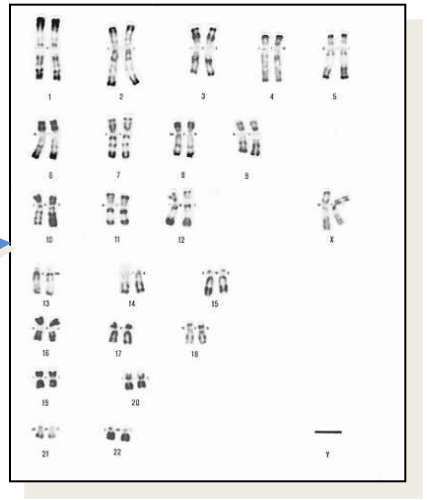
Cellules en suspension
(sang, moelle ou ganglion)

Culture 24-48h
Stimulation ou non pour obtention de mitoses

Blocage des mitoses en métaphase (colchicine)
Destruction des membranes cellulaires (choc hypotonique)

Analyse des chromosomes après dénaturation et coloration

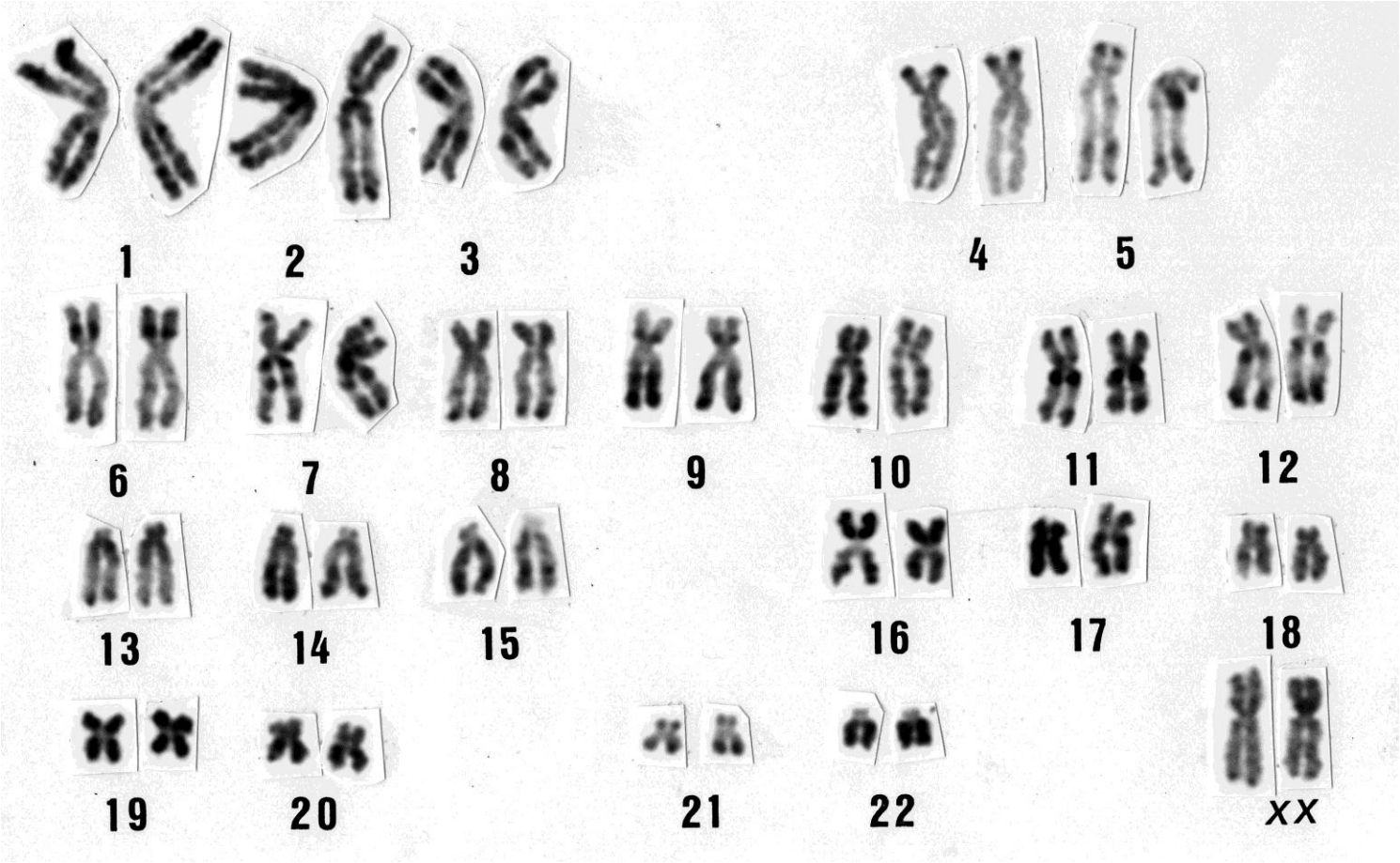




Cytogénétique

Cytogénétique conventionnelle: caryotype

Caryotype normal



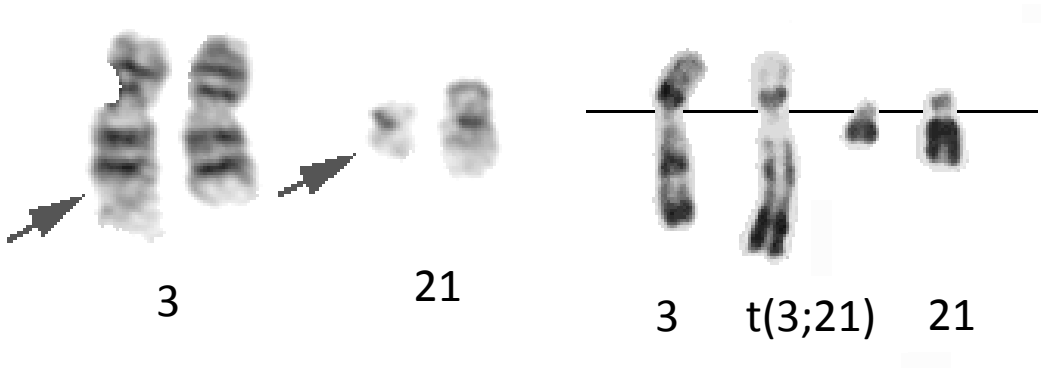
Cytogénétique

Cytogénétique conventionnelle: caryotype

Caryotype anormal:

Anomalie clonale

Translocation t(3;21)



Suivi de la MRD en cytogénétique conventionnelle:

Evaluation au cours du traitement du pourcentage de cellules porteuses de l ’anomalie chromosomique spécifique

Cytogénétique

Cytogénétique conventionnelle: caryotype

Avantages :

Large spectre d ’anomalies (analyse sans *a priori*)

Suivi de l ’évolution clonale (= acquisition d’anomalies additionnelles)

Inconvénients :

Liés à la culture :

uniquement les cellules en cycle

cellules peu proliférantes => échecs de culture

Anomalies difficile à identifier (inv(16))

Très faible sensibilité (10^{-2}) ≈ cytologie

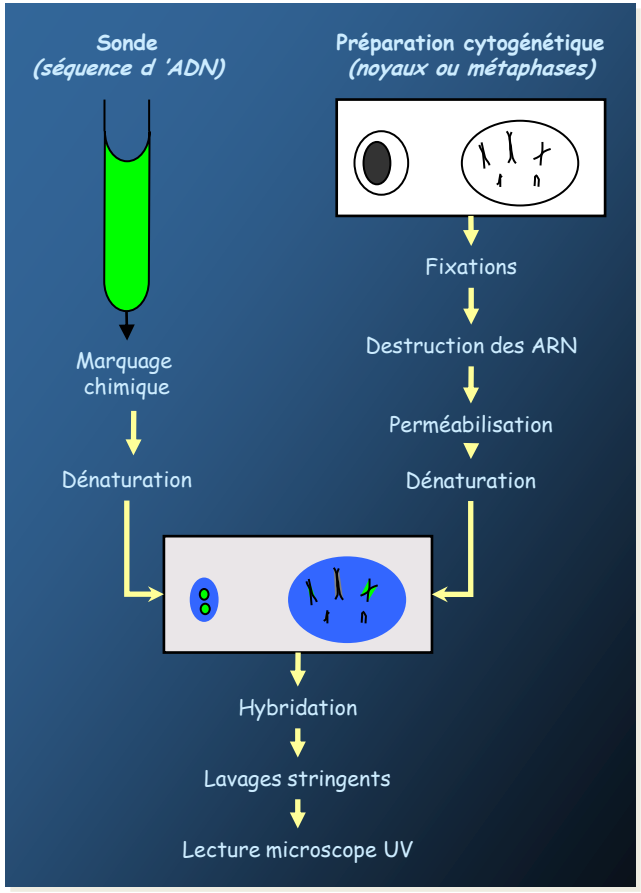
En pratique : réalisée mais peu sensible (LMC protocolaire ou si perte de réponse)

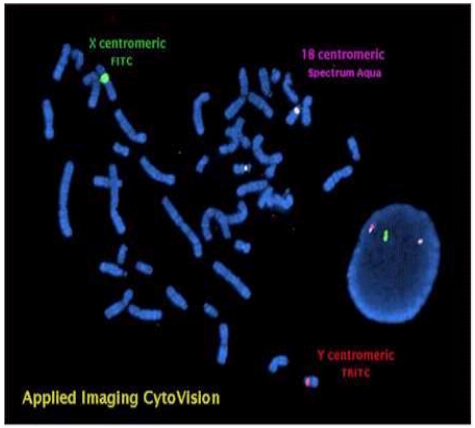
Cytogénétique

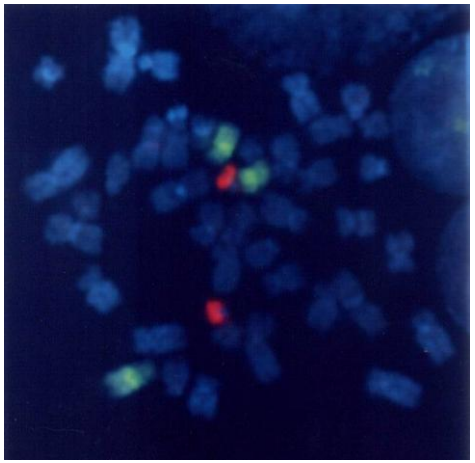
Cytogénétique moléculaire: FISH

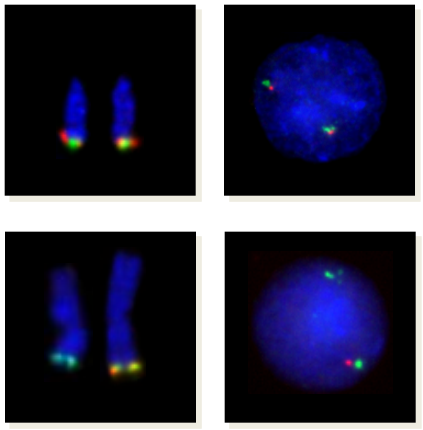
Principe:

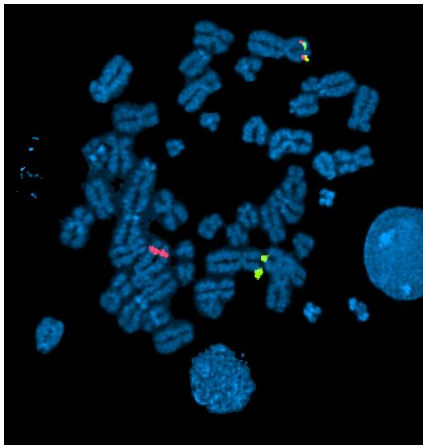
Hybridation de sondes fluorescentes d'ADN simple brin sur une séquence génomique complémentaire











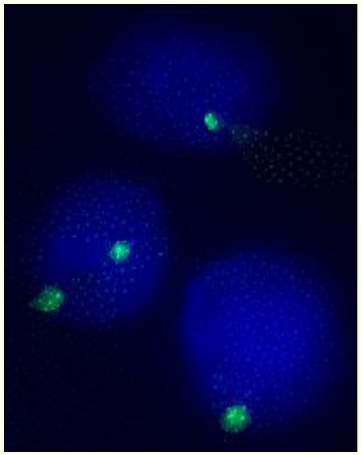
Cytogénétique

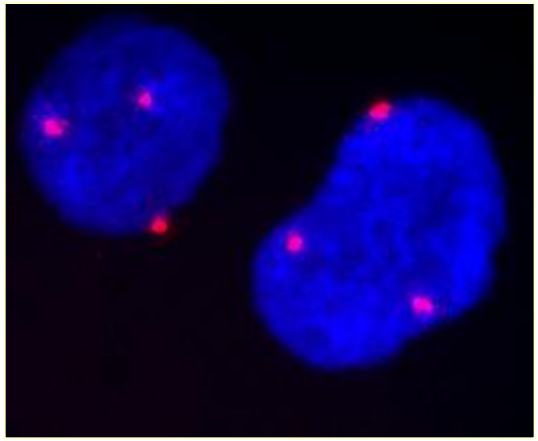
Cytogénétique moléculaire: FISH

Recherche du même type d'anomalies clonales qu'au caryotype

Anomalies de nombre

Monosomie 7

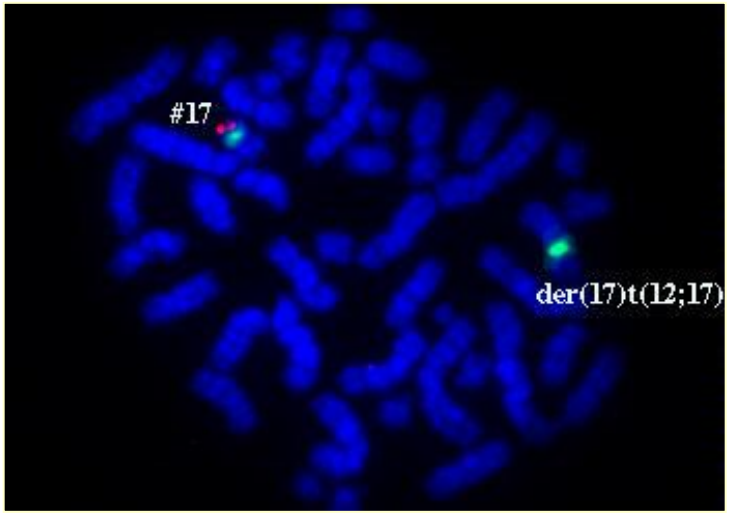


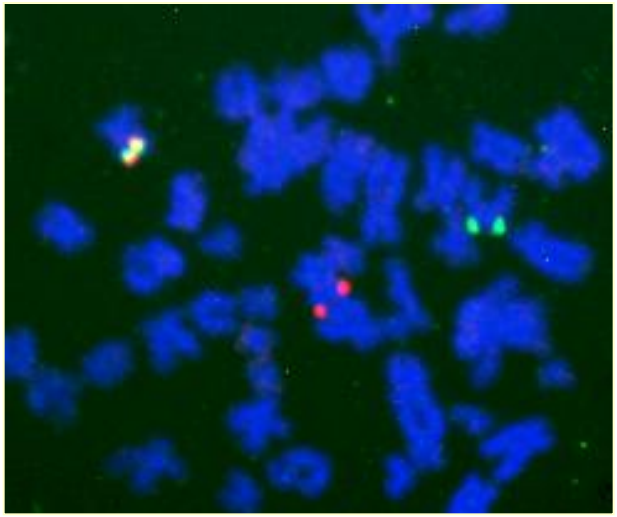


Trisomie 8

Anomalies de structure

17p-





t(10;11)

Cytogénétique

Cytogénétique moléculaire: FISH

Suivi de la MRD: idem caryotype

Evaluation au cours du traitement du pourcentage de cellules porteuses de l ’anomalie chromosomique spécifique

Avantages:

Analyse de plus de cellules (noyaux interphasiques et métaphases)

Inconvénients:

Faux positifs (fausse monosomie par superposition de signal, hybridation partielle)

Sondes spécifiques

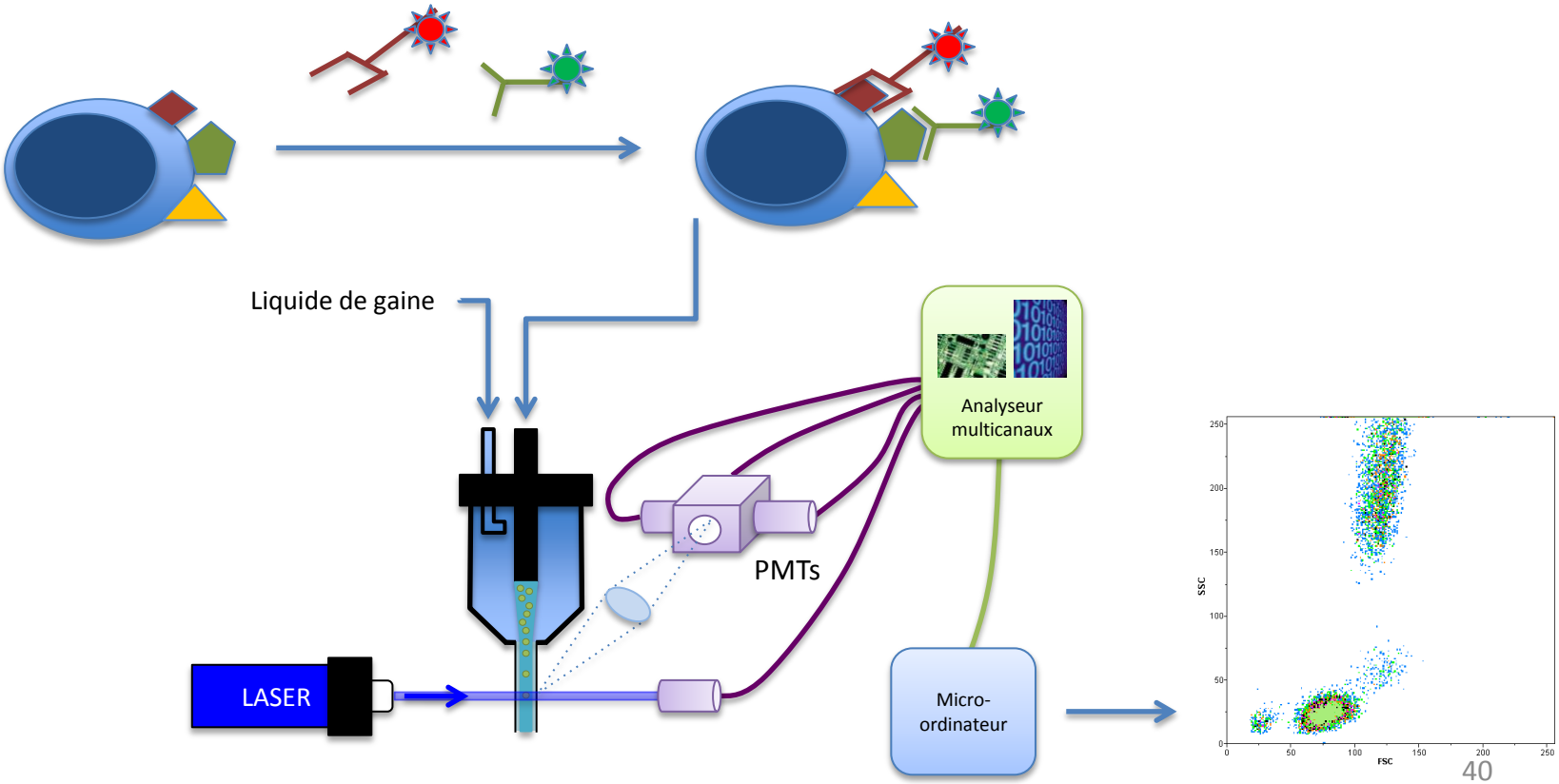
Sensibilité semblable à la cytologie, 10^{-2}

En pratique: réalisée mais pas une bonne technique de suivi de la MRD

Cytométrie en flux (CMF)

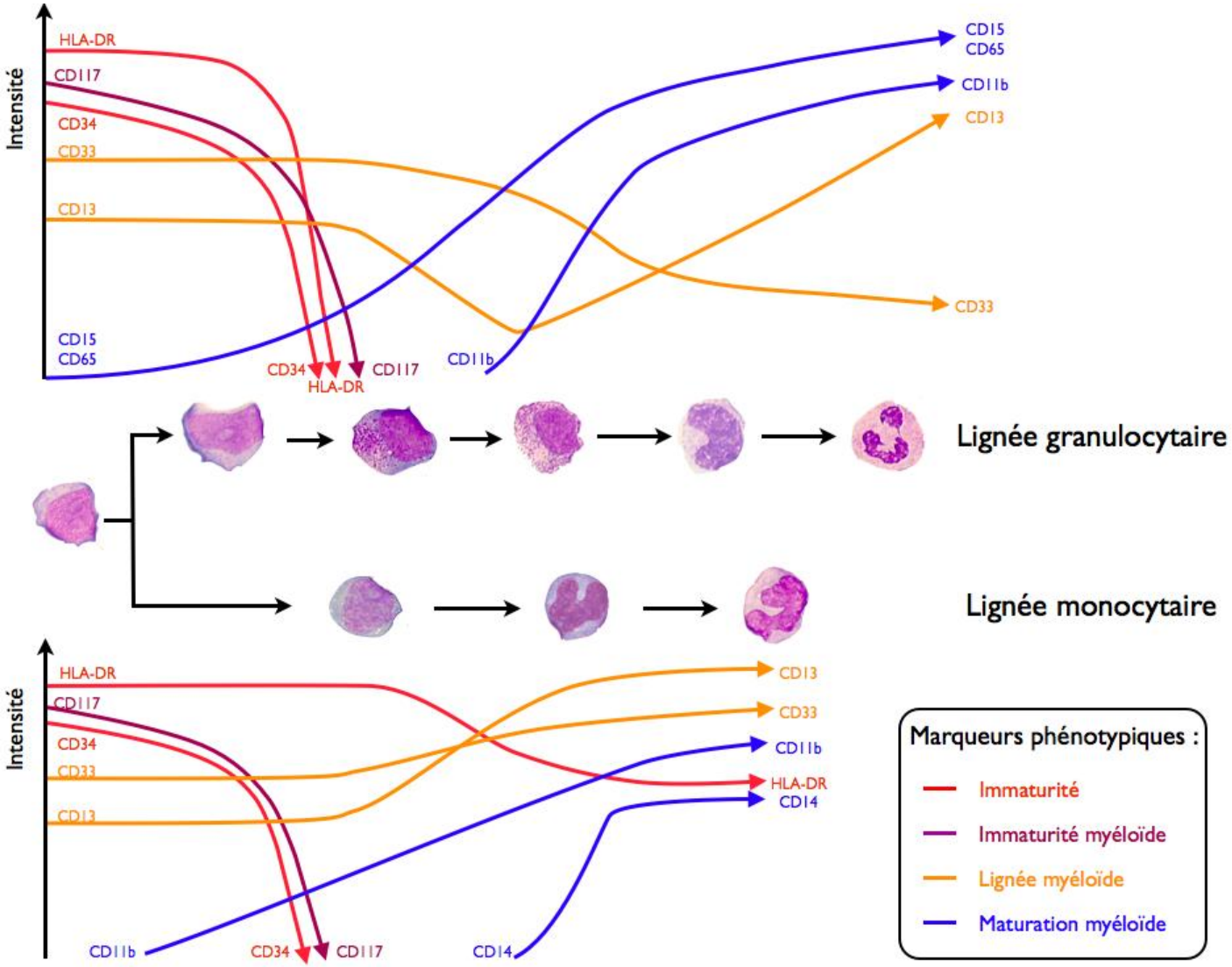
Principe:

Mise en évidence d'antigènes (Ag) de surface ou intra-cytoplasmique grâce à l 'utilisation d'anticorps spécifiques marqués par un fluorochrome



Cytométrie en flux (CMF)

Phénotypes



Cytométrie en flux (CMF)

Intérêts:

Permet d'identifier les cellules blastiques ou lymphoïdes anormales sur des caractères morphométriques (taille et structure) mais également sur la base des antigènes exprimés à la surface des cellules (CDx)

Caractéristique des cellules tumorales: SIGNATURE TUMORALE

Syndrome lymphoprolifératif chronique: expression d'un phénotype plus ou moins spécifique selon la pathologie

CD19+/CD5+/CD23+/CD43+/CD10- dans la LLC

CD19+/CD5+/CD23-/CD43-/CD10- dans le lymphome du manteau (MCL)

CD19+/CD5-/CD10+ dans le lymphome folliculaire (FL)

CD19+/CD5-/CD11c+/CD25+/CD103+/CD123+ dans la leucémie à tricholeucocytes

Leucémies aiguës:

Aberrations phénotypiques retrouvées dans plus de 90% des cas

=> **Leukemia Associated ImmunoPhenotype (LAIP)** ou **Leukemia Associated Phenotype (LAP)**

Cytométrie en flux (CMF)

LAIP

Différents types de LAIP:

Expression asynchrone d'antigène (CD34/CD15 par exemple)

Infidélité de lignée (expression du CD7 sur des blastes myéloïdes par exemple)

Surexpression de marqueurs antigéniques

Perte d'expression d'un marqueur (trou phénotypique, tel que la perte du CD33 sur des blastes myéloïdes)

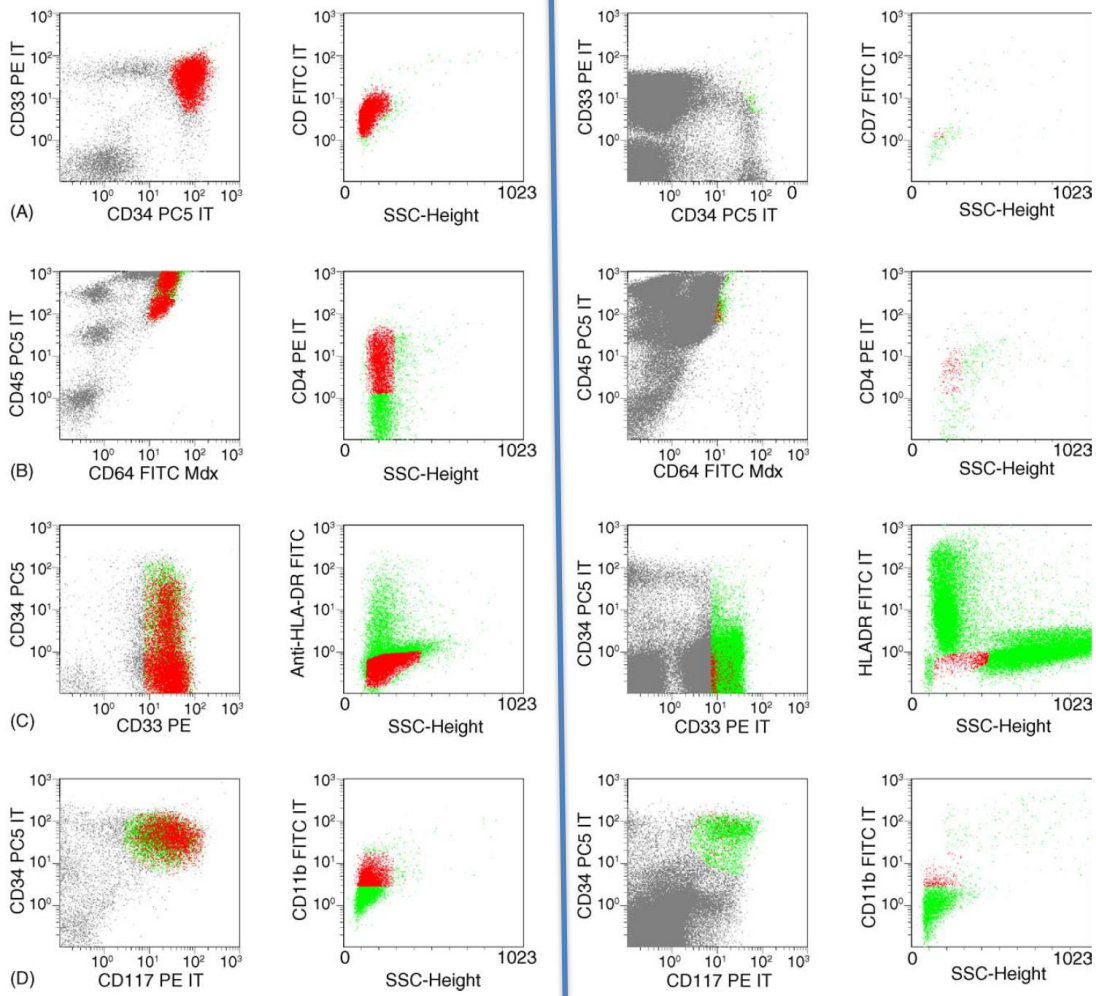
Modification des paramètres morphométriques (taille-structure aberrantes)

Certains phénotypes aberrants peuvent se retrouver dans une moelle normale mais à des taux très faibles

$\Rightarrow$ nécessité de définir des valeurs seuils pathologiques pour chaque type de LAIP

Cytométrie en flux (CMF)

LAIP et LAM



LAM

Moelle normale

Infidélité de lignée

$CD34^{+}CD33^{+}CD7^{+}$

Surexpression

$CD64^{+}CD4^{+}$

Perte d'expression

$CD34^{+}CD33^{+}HLA\text{-}DR^{-}$

Expression asynchrone

$CD34^{+}CD117^{+}CD11_{b}^{+}$

Kern et al. Crit Rev Oncol Hematol 2003

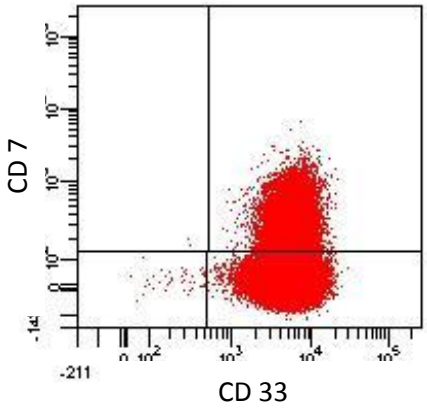
Cytométrie en flux (CMF)

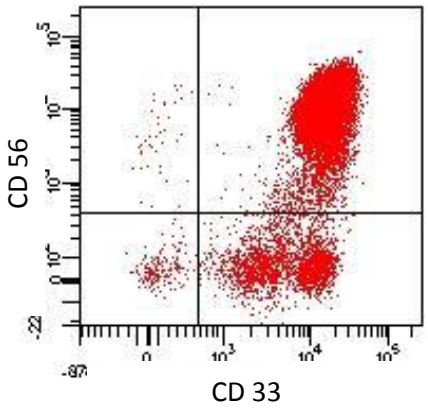
LAIP

Marqueurs infidèles de lignée : 30% des LAM

- CD7 : exprimé dans 20% des cas de LAM mais dans 40% des LAM0, LAM1
  - Facteur de mauvais pronostic (cytogénétique défavorable ou FLT3-ITD)

- CD56 : exprimé dans 20% des cas de LAM mais dans 50% des LAM t(8;21) et des LA monoblastiques et promyélocytaires
  - Facteur de mauvais pronostic (Raspadori et al, Leukemia 2001)



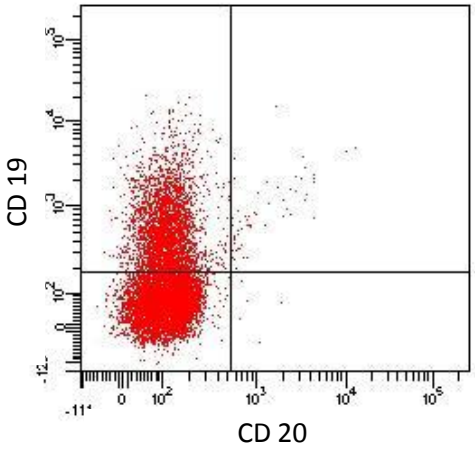


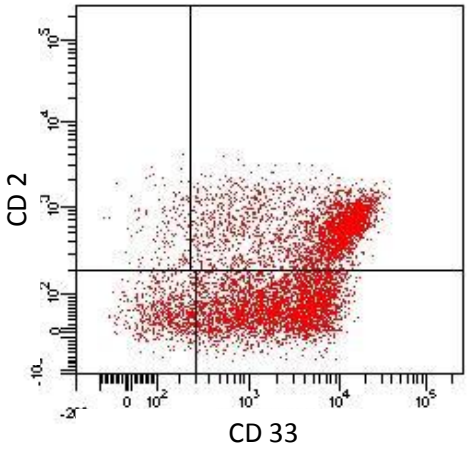
Cytométrie en flux (CMF)

LAIP

<u>Marqueurs infidèles de lignée</u> : 30% des LAM

- CD19 : exprimé dans 16% des LAM mais associé à la t(8,21) dans 90% des cas
- CD2 : exprimé dans 8% des LAM mais dans 75% des LA promyélocytaires variantes, dans 48% des LA avec inv (16) et dans 19% des LA monoblastiques
  - Mauvais pronostic si non associé à une inv (16) (Legrand et al, Blood 2000; Perea et al, Leuk res 2005)
- CD5 : exprimé, plus rarement, dans 4% des LAM





Cytométrie en flux (CMF)

LAIP

Marqueurs infidèles de lignée : 30% des LAL-B

- CD13
- CD33

} Faiblement exprimés

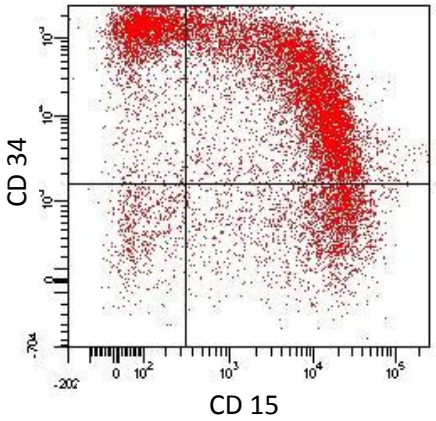
Chez l'enfant, plutôt associés aux LAL B-II : pas d'impact pronostic

Chez l'adulte, associés le plus souvent à la t(9;22): très mauvais pronostic

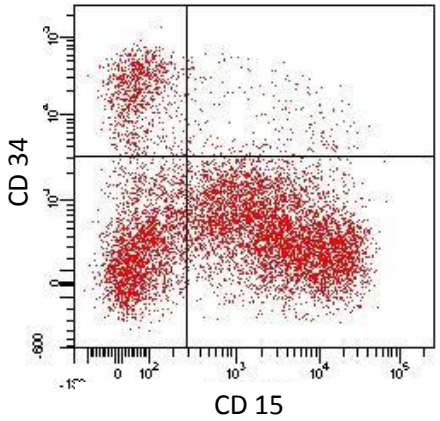
Cytométrie en flux (CMF)

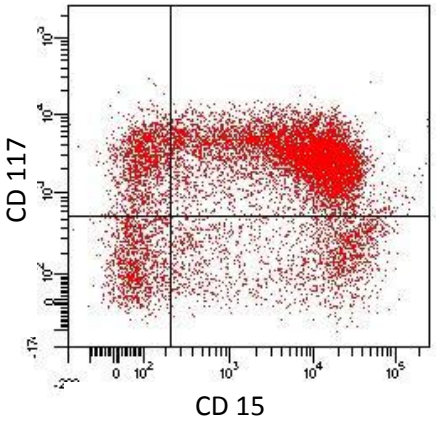
LAIP

<u>Asynchronisme d'expression</u> : 80% des LAM

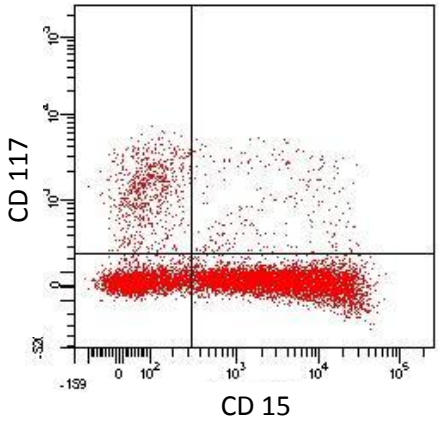


Co-expression CD34 / CD15





Co-expression CD117 / CD15

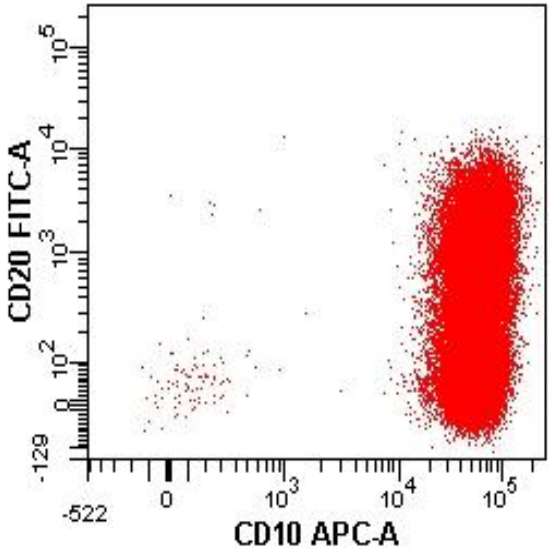


Moelle normale

Cytométrie en flux (CMF)

LAIP

<u>Asynchronisme d'expression</u> : particulièrement fréquent dans les LAL phi+



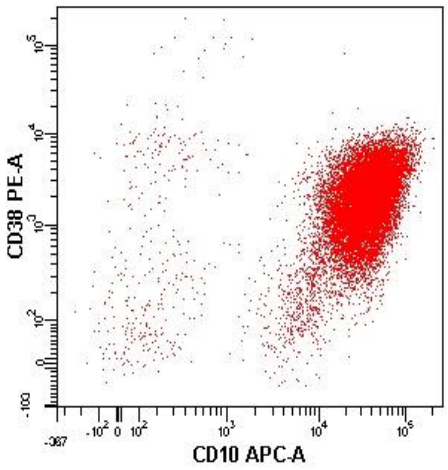
Co-expression CD20 / CD10 fort

Cytométrie en flux (CMF)

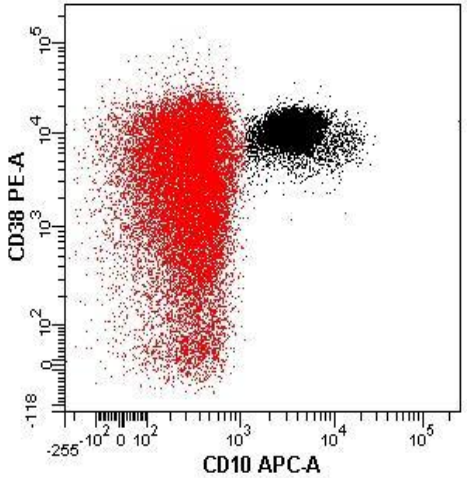
LAIP

<u>Modifications de l'intensité d'expression</u> :

- Par rapport aux hématogones



Cellules blastiques

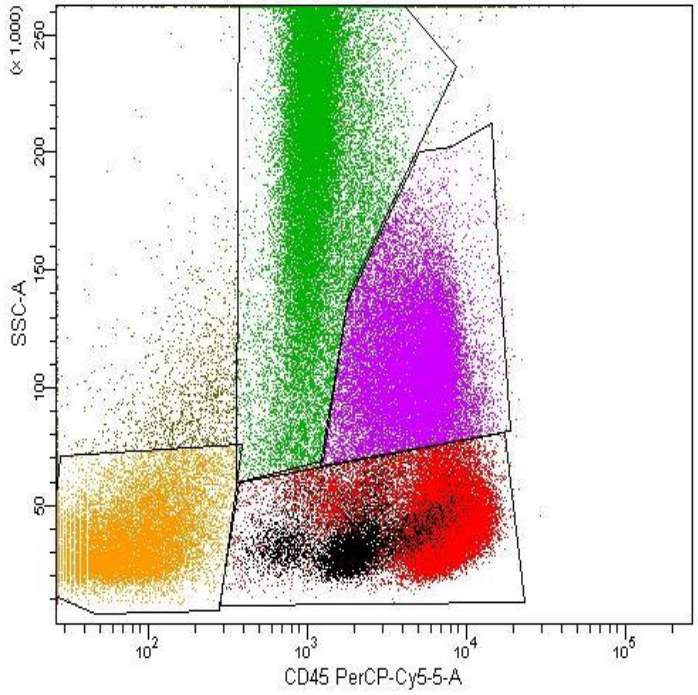


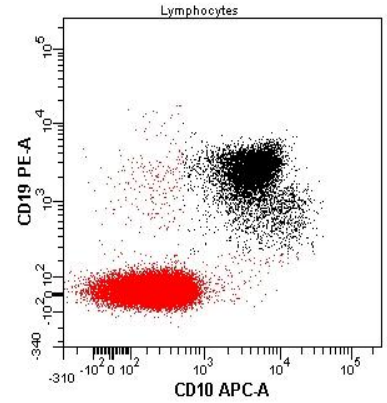
Moelle normale

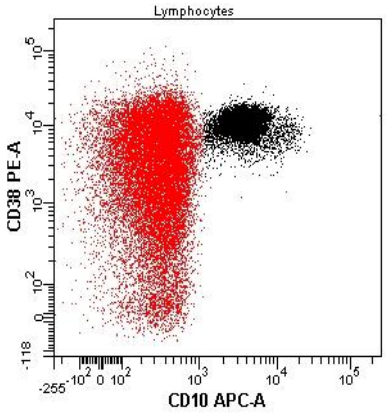
Sous-expression du CD38 sur les lymphoblastes B

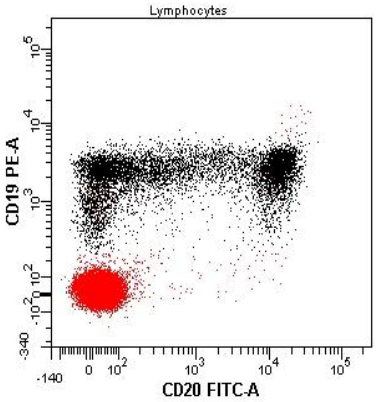
Critères de différenciation entre hématogones (en noir) et lymphoblastes B

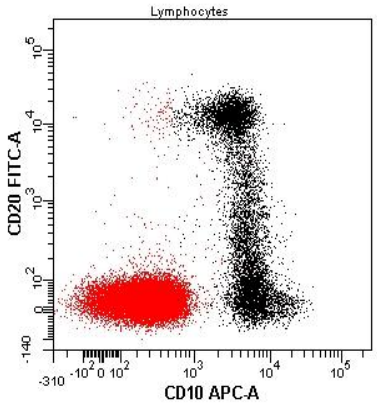
Les Hématogones











Hématogones

Cellules précurseurs des Lymphocytes B

CD19+/CD10++/CD38++

CD20-/+

Cytométrie en flux (CMF)

Avantages:

Sensibilité supérieure aux techniques de cytogénétique

Sensibilité augmentant avec les performances techniques des derniers appareils (8-10 couleurs / grand nombre de cellules analysables)

Particulièrement utile en l'absence d'anomalie génétique

Inconvénients:

Technique difficile: mise au point +++ / grand nombre de cellules à analyser

Stabilité des LAIP => multiplier le nombre de LAIP à suivre

Panel d'anticorps large

Problème de fixation non spécifique d'anticorps / valeur seuil

En général moins sensible que la biologie moléculaire

Applications en suivi de MRD:

LAL

En évaluation dans les LAM

Intérêt +++ dans les LA sans marqueur cytogénétique ni moléculaire

En évaluation dans les SLPC, en particulier la LLC

MRD
Applications cliniques

Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)

Suivi du **transcrit BCR-ABL**

Leucémies Aiguës:

LAL : **réarrangement** IG/TCR ou **translocation** et **CMF**

LAM : **translocation** ou **gènes** mutés/surexprimés et **CMF**

Leucémie Lymphoïde Chronique:

CMF et réarrangement IGH

Autres SLPC: **CMF**

Lymphome du manteau: réarrangement IGH (+/-BCL1)

Lymphome folliculaire : réarrangement IGH (+/-BCL2)

Myélome : réarrangement IGH (+/- translocation)

Leucémie à tricholeucocytes : réarrangement IGH +/- BRAF muté

Stratégies possibles

Choix de la technique selon marqueur tumoral

Hémopathies **AVEC** transcrit spécifique (translocation fonctionnelle)

- RT-PCR: qualitatif
- RQ-PCR: quantitatif
  - Exp: LMC, LAM CBF, LAP, LAL avec translocation

Hémopathies **SANS** transcrit spécifique

- Mutations génétiques: RQ-PCR (NPM1, FLT3)
- Expression aberrante d'ARNm: RQ-PCR (WT1, EVI1)
- Clonalité lymphoïde IGH ou TCR: RQ-PCR
  - Exp: LAL sans translocation, lymphomes (MCL…)

- Cytogénétique: caryotype ou FISH

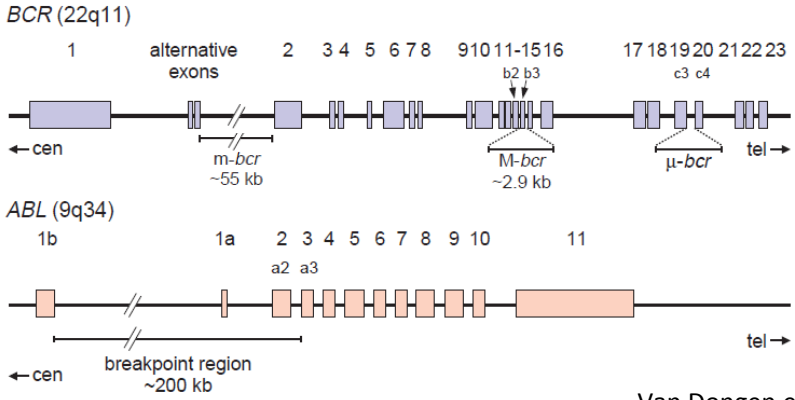
- Phénotype aberrant: CMF
  - LAIP dans les LA
  - Phénotypes « tumoraux »
    - Exp: Syndromes lymphoprolifératifs chroniques: LLC+++

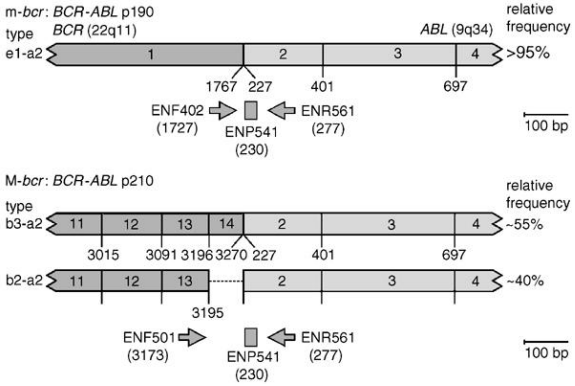
Leucémie myéloïde chronique (LMC)

MRD

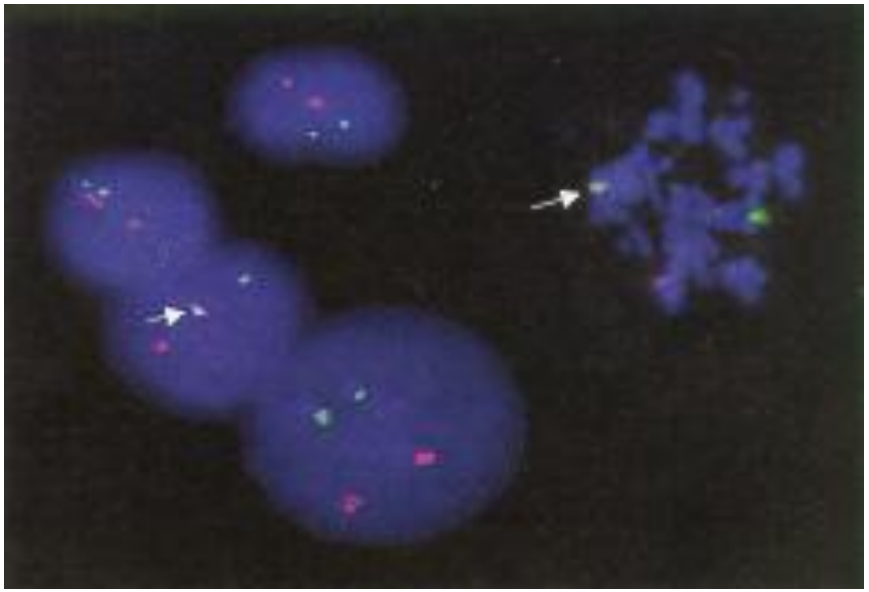
Méthode	Cible	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
Morphologie	Morphologie cellulaire	5%	Standard	Sensibilité très médiocre
Cytogénétique	Translocation t(9;22)	1-5%	Applicable chez tous les patients	Sensibilité médiocre Moelle osseuse uniquement
FISH	Marqueur spécifique	0,1-5%	Rapide (1-2 jours)	
RQ-PCR	ARN (transcrit BCR-ABL)	10^{-4} – 10^{-6}	Très sensible	Standardisation Expertise

BCR-ABL p190 et p210



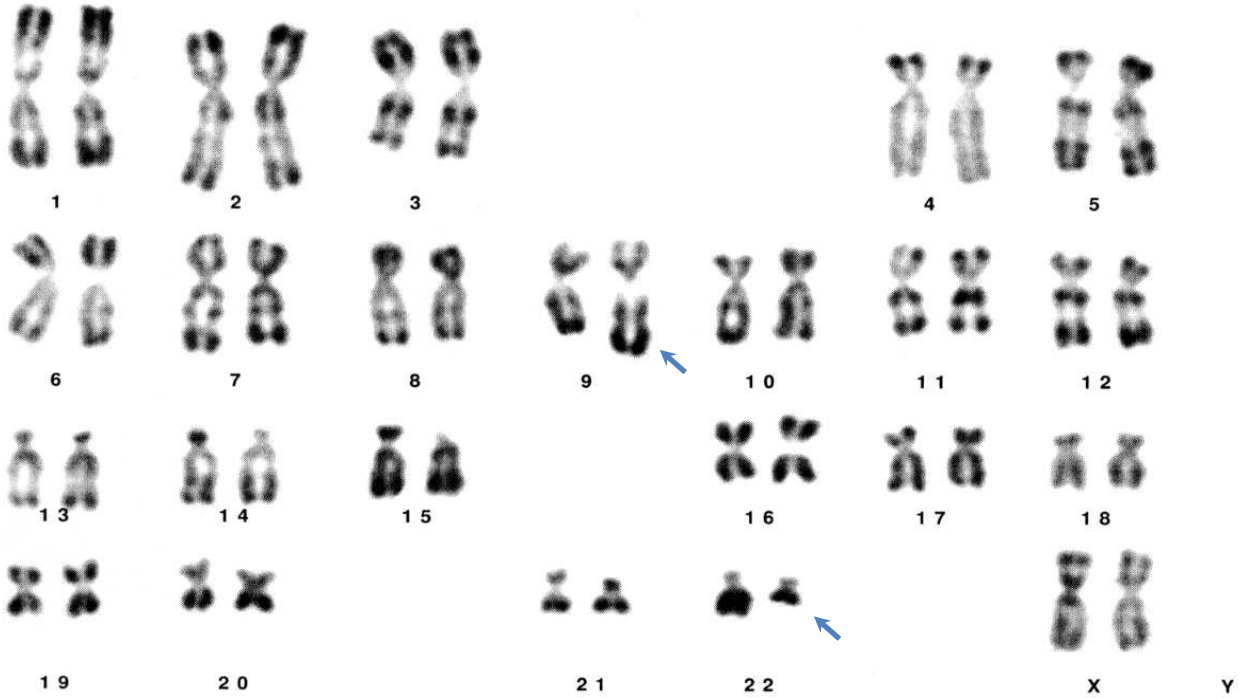


Van Dongen et al. Leukemia 1999
Gabert et al. Leukemia 2003



FISH

Chromosome Philadelphia

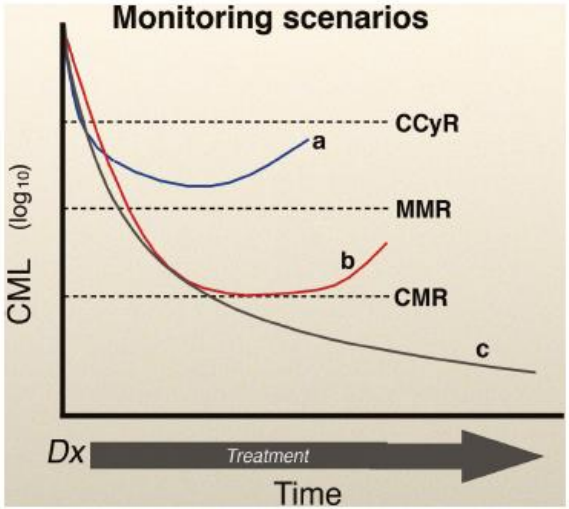


Caryotype

Leucémie myéloïde chronique (LMC)

MRD

Niveau de réponse	Définition
Réponse hématologique complète	Hémogramme normal
Réponse cytogénétique mineure	35%-90% de métaphases Ph+
Réponse cytogénétique partielle	1%-34% de métaphases Ph+
Réponse cytogénétique complète (CCyR)	0% de métaphase Ph+
Réponse moléculaire majeure (MMR)	≥ 3 log de réduction du taux de transcrit BCR-ABL
Rémission moléculaire complète	Transcrit BCR-ABL indétectable



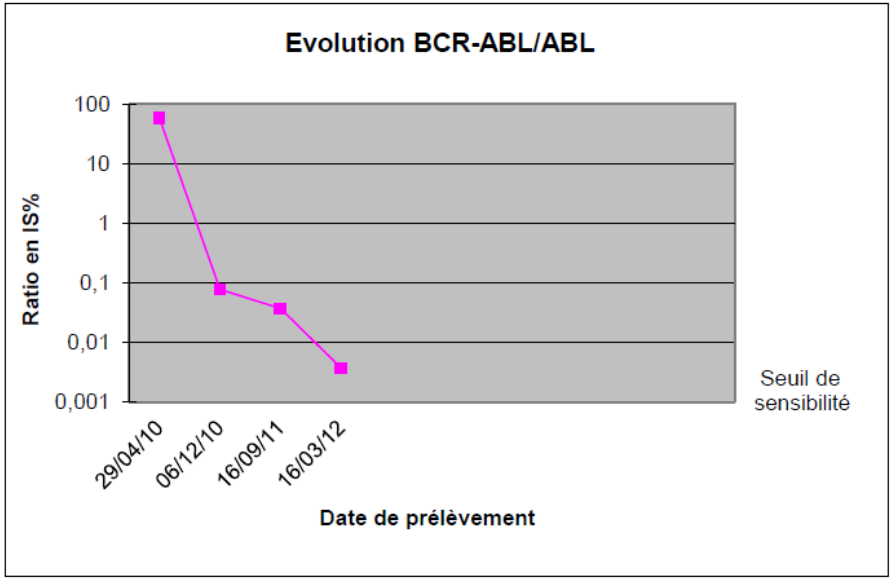
Radich. Blood. 2009

Leucémie myéloïde chronique (LMC)

Exemple

Type de Transcrit: M-BCR b3-a2

N° dossier	Type de prélèvement	Date de prélèvement	Ratio Cible/CG	Ratio BCR-ABL/ABL en IS (%)	Traitement	mutation
46007205	Sang 285-10	29/04/10	0,5	58		
126392827	Sang 817-10	06/12/10	0,001	0,1	Glivec 400 mg/j mai 2010	
1096568073	Sang 583-11	16/09/11	0,0004	0,04	Glivec 400 mg/j mai 2010	
2036681847	Sang 188-12	16/03/12	0,0000	0,004	Glivec 400 mg/j mai 2010	



≥ 3 log de réduction => Réponse moléculaire majeure

Leucémie aiguë myéloïde (LAM)

MRD

LAM avec translocation: RQ-PCR

LAM t(8;21)

=> suivi sur le taux de transcrit AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1)

LAM inv(16)

=> suivi sur le taux de transcrit CBFß-MYH11

LAP t(15;17)

=> suivi sur le taux de transcrit PML-RARA

LAM à caryotype normal ou sans translocation:

RQ-PCR

Mutation NPM1

Duplication en tandem FLT3-ITD

Surexpression de WT1

Autres marqueurs en cours d'évaluation

CMF

LAIP

Table 1. Quantitative RT-PCR MRD markers in AML

Marker	Chromosome(s)	Frequency, %	Sensitivity*
Fusion transcripts			
PML-RARA	t(15;17)	7[12]	1:5000-1:200 000
RUNX1-RUNX1T1	t(8;21)	6[12]	1:3000-1:500 000
CBFB-MYH11	inv(16)	7[12]	1:5000-1:100 000
DEK-CAN	t(6;9)	1[12]	1:400-1:4000
Overexpressed genes			
WT1	11p13	80[13]	1:10-1:500/1:30-1:2000†
Mutated genes			
NPM1c	5q35	25[13]	1:10 000-1:100 000
dupMLL	11q23	6[13]	1:100-1:2000‡
FLT3-ITD	13q12	23[13]	1:10 000

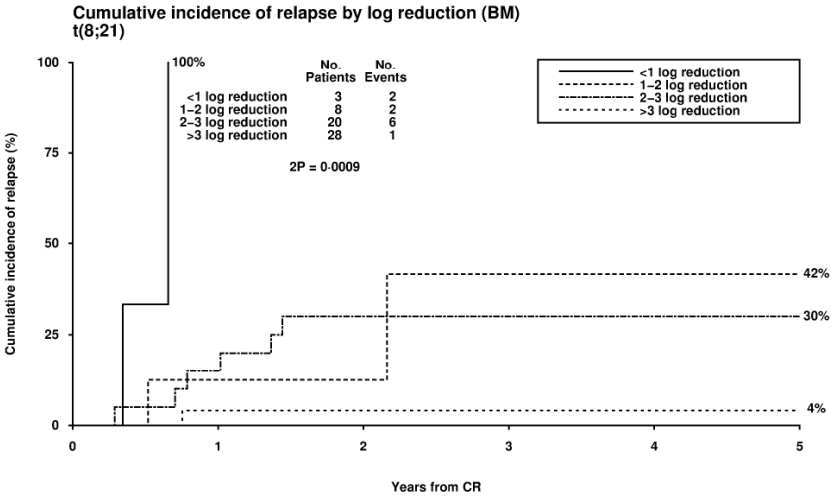
*Sensitivity based on data in patient MRD follow-up performed at Laboratory of Immunohematology, Aarhus University Hospital and Munich Leukemia Laboratory (Susanne Schnittger, oral communication).

†Sensitivity given as BM sensitivity/PB sensitivity and adjusted for expression in normal hematopoiesis.

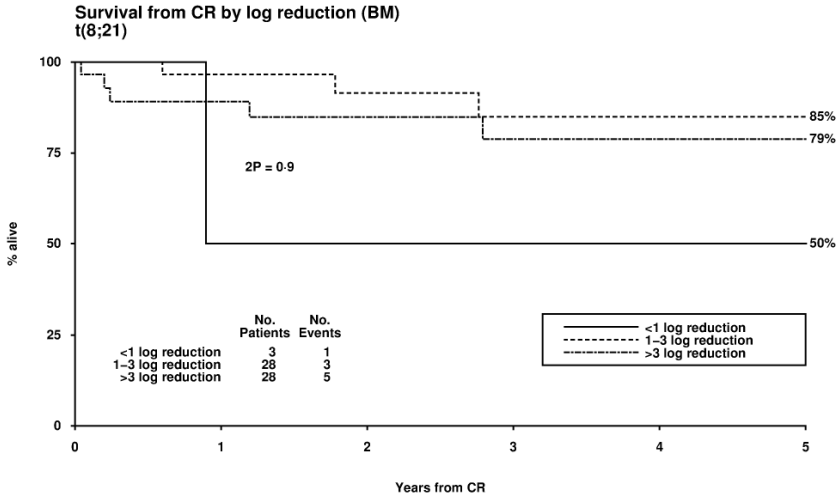
‡Sensitivity adjusted for expression in normal hematopoiesis.

Hokland et al. Blood. 2001

LAM avec tranlocation



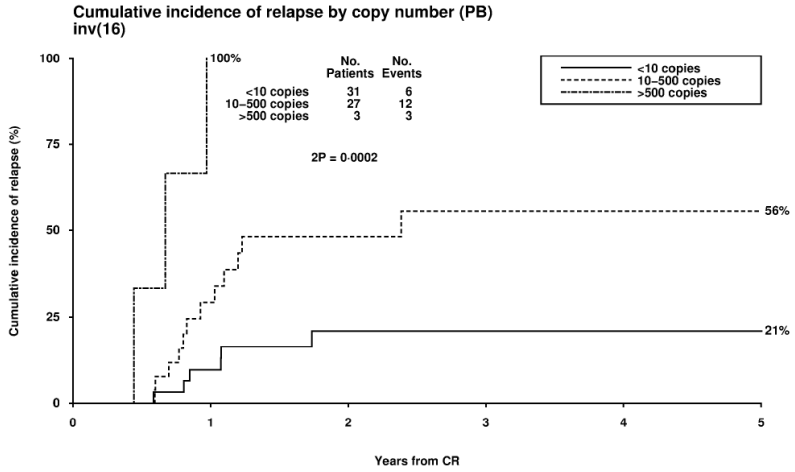
t(8;21)



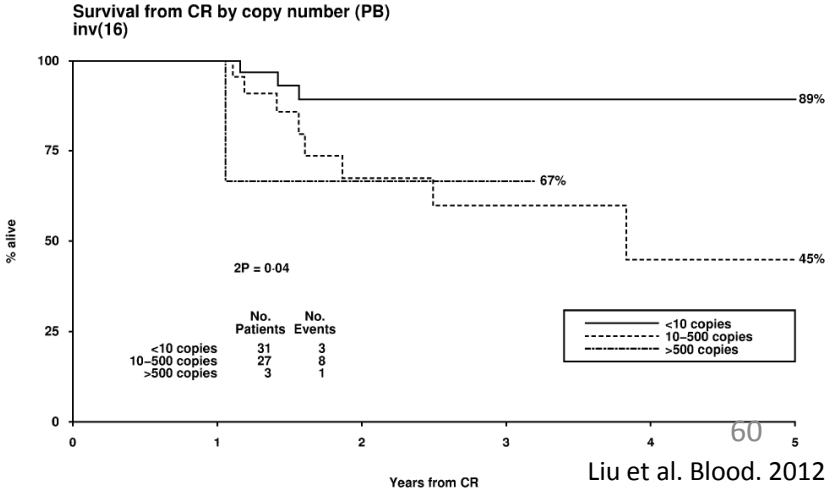
Risque de rechute

VALEUR PRONOSTIQUE+++

Survie globale



Inv(16)



Liu et al. Blood. 2012

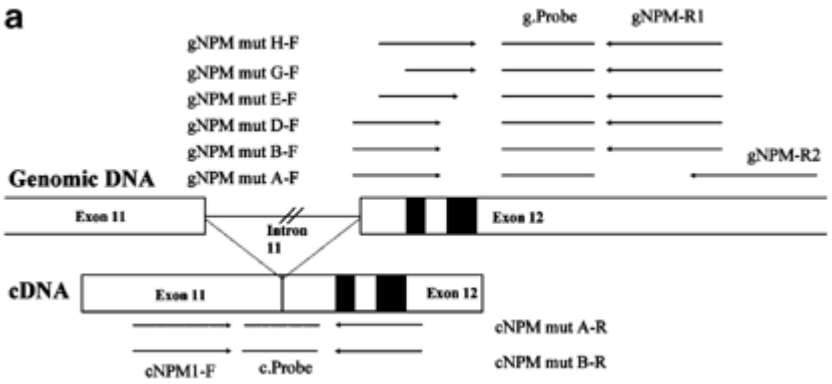
Gènes mutés dans les LAM

NPM1

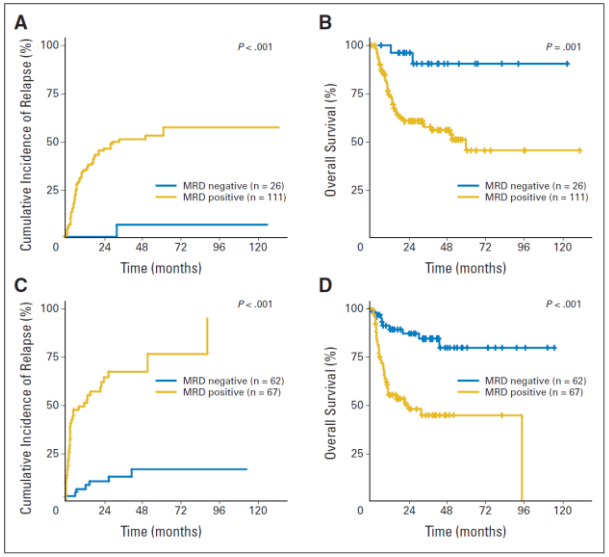
FLT3-ITD

Matériel: ADN ou ARN (ADNc)

NPM1



Gorello et al. Leukemia 2006



Post-induction

Post-traitement

Valeur pronostique majeure de la MRD sur NPM1

Krönke et al. JCO 2011

Surexpression de gènes dans la LAM

WT1

Matériel: ARN (ADNc)

Technique: RQ-PCR

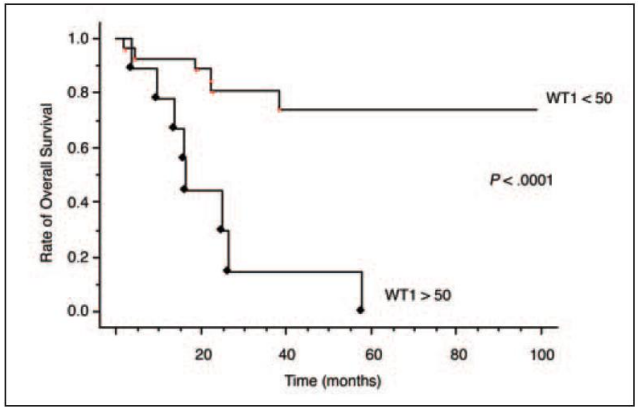
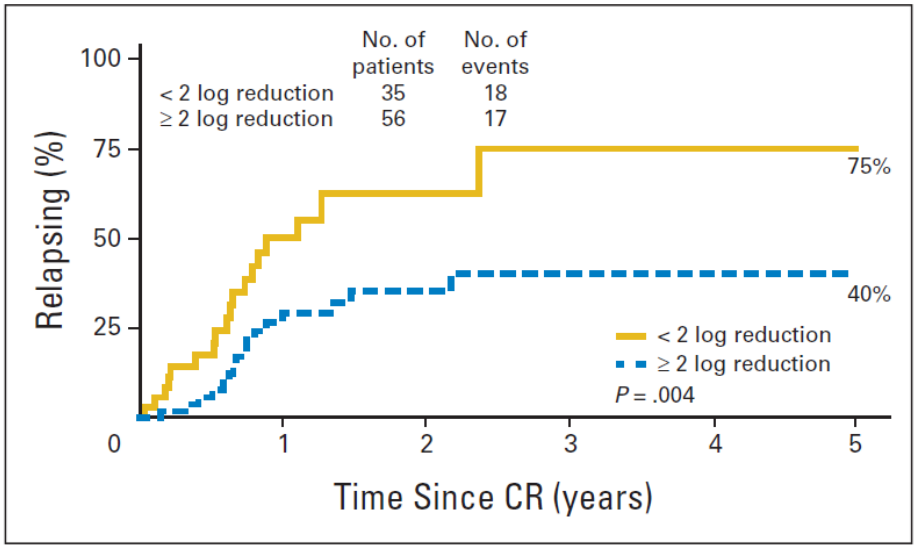


Fig 4. Overall survival (OS) according to Wilms' tumor gene 1 (WT1) value at D35-50. Kaplan-Meier plot of OS of 36 patients WT1+ at diagnosis with follow-up at D35-50 after induction treatment: (1) one group with a WT1 level above 50 (n = nine of 36) and (2) second group below 50 (n = 27 of 36).

MRD LAM enfant en post-inducion

Lapillonne et al. JCO 2009

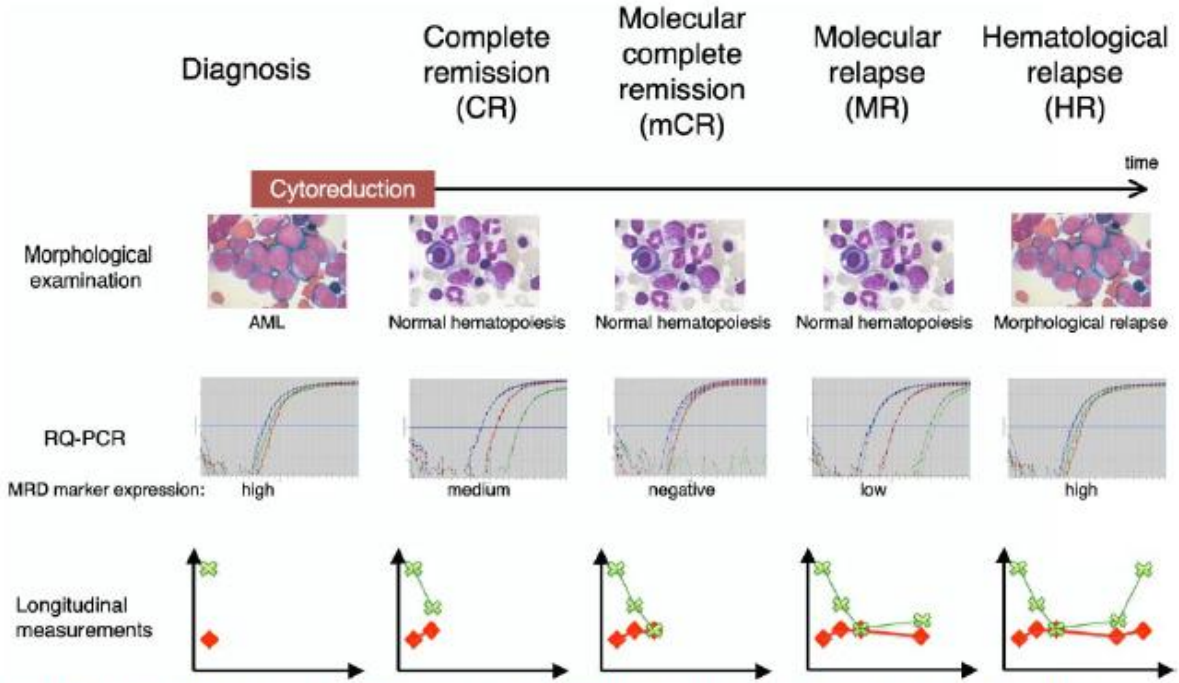
Le taux de WT1 post-induction est prédictif de la rechute de la LAM



Cilloni et al. JCO 2009

Perspectives dans les LAM

Marqueurs potentiels



Hokland. Blood. 2011

Figure 2. Terminology in MRD measurements. Definitions are based on the presence of blasts on light microscopy examination and disappearance of RT-PCR positivity in a sample with an acceptable sensitivity. RT-PCR panels represent raw data from MRD measurements of a patient using 2 control genes (red and blue curves) and one MRD marker (green curve). Longitudinal measurements represent MRD reporting as recommended by European Leukemia Network[4] showing the MRD level (green crosses and lines) as well as the sample day-to-day sensitivity (red diamonds and lines).

<u>Insertion/duplication:</u>

MLL-PTD

FLT3-TKD

<u>Surexpression de gènes:</u>

EVI1

PRAME

BAALC

ERG

MN1

<u>Mutations de gènes:</u>

KIT / RAS (NRAS / KRAS)

PTPN11

RUNX1 / CEBPA

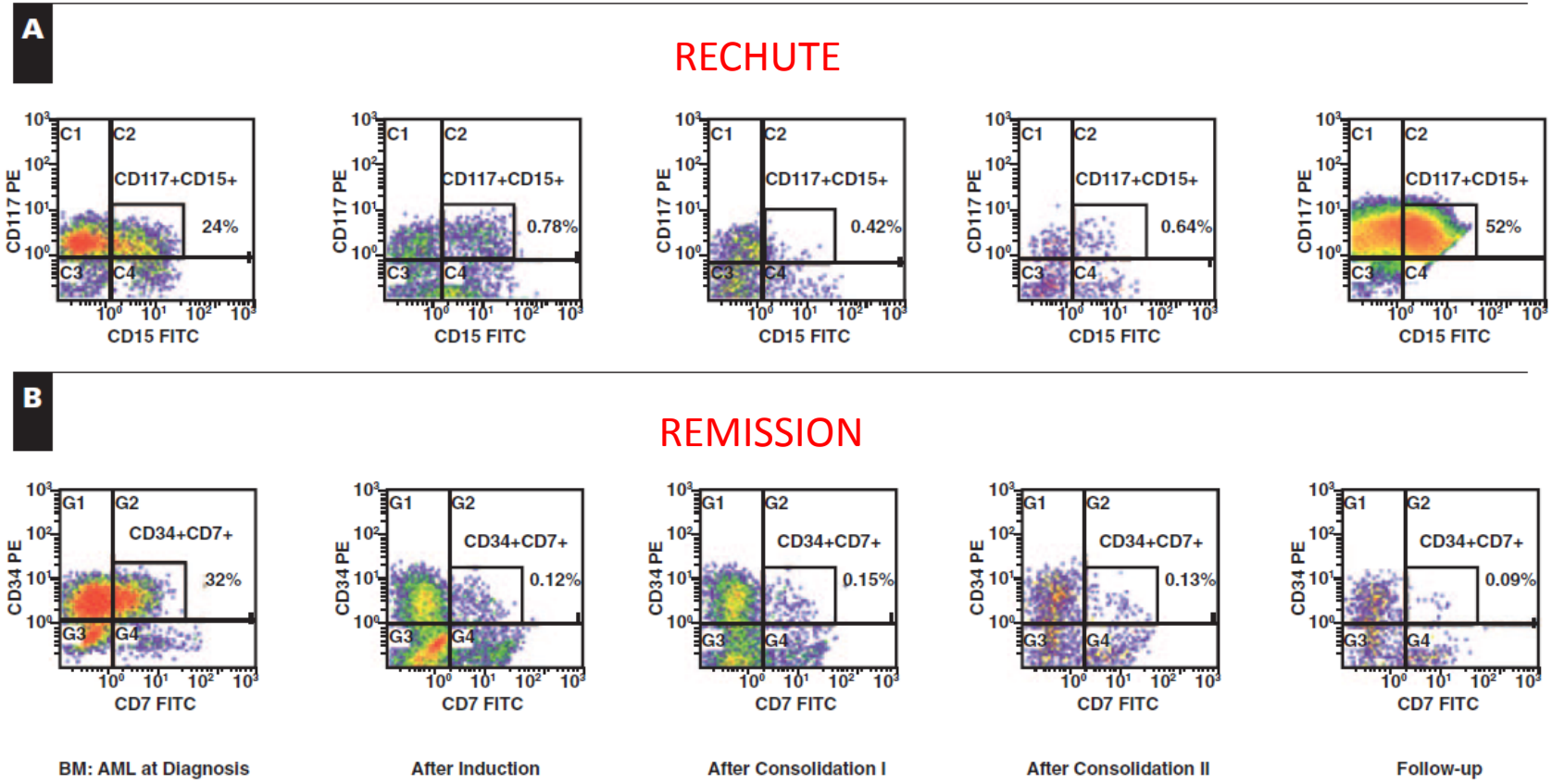
IDH1

TP53

JAK2 / MPL

LAM et CMF

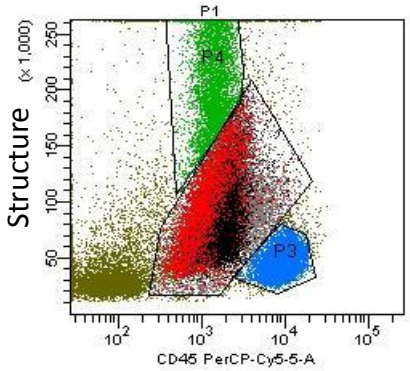
Recherche de LAIP au diagnostic (plusieurs): présents dans >90% des LAM
Suivi des LAIP au cours du traitement et de l'évolution

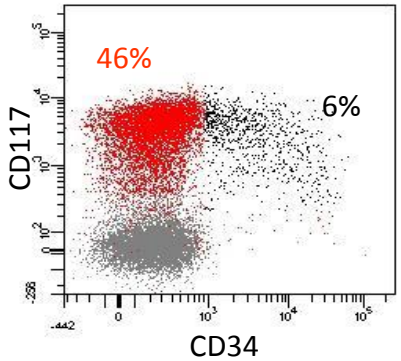


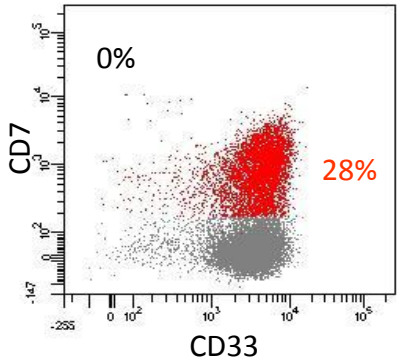
Al-Mawali et al. American Journal of Clinical Pathology 2009

Diagnostic

le 18/05/2009

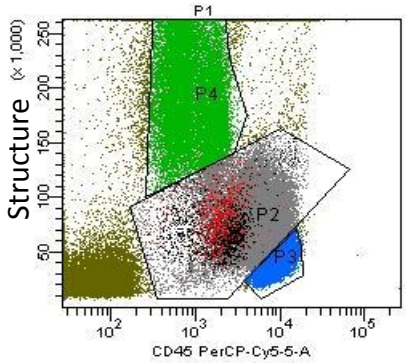


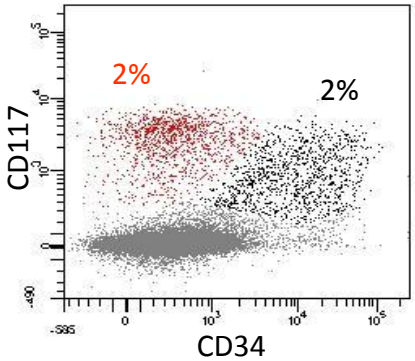


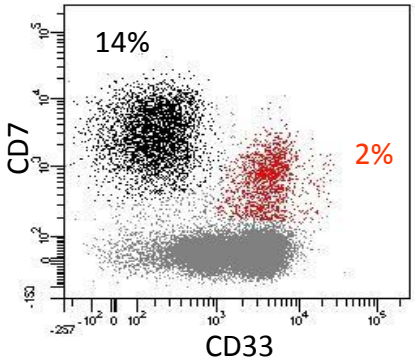


MRD positive

le 17/08/2009

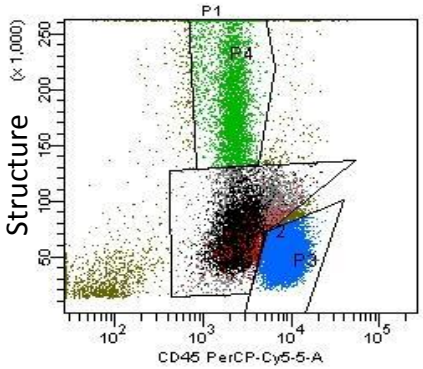


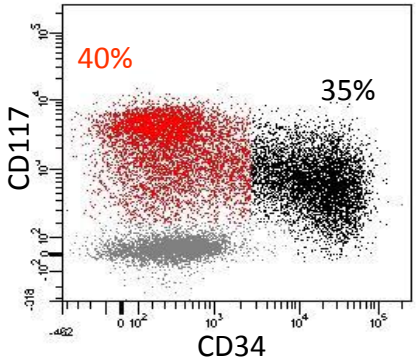


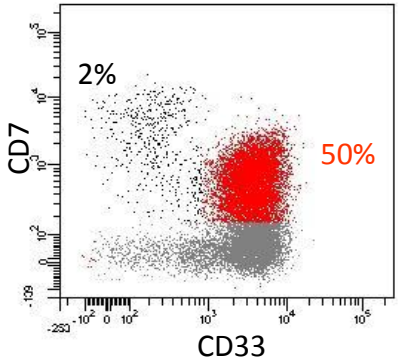


Rechute

le 27/08/2009







Répartition des LAIP

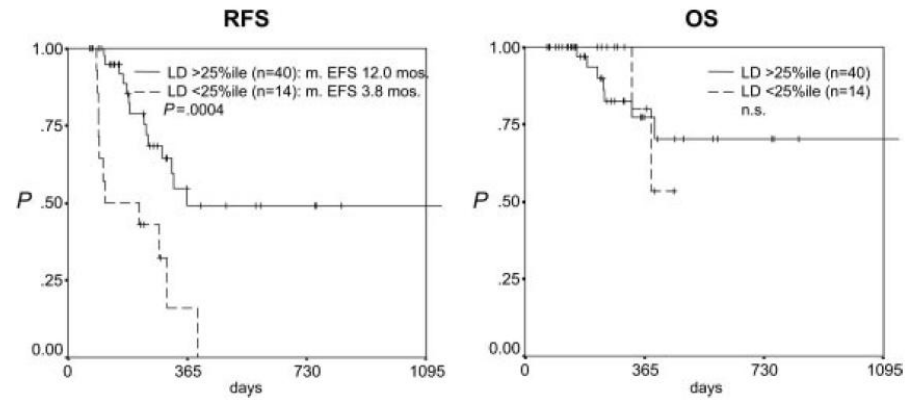
Frequencies of LAPs in 51 Patients With AML

LAPs (n = 200)	No. of Cases	Range of Positive Cells in AML Bone Marrow (%)
Lineage infidelity (n = 40)		
CD34+/CD2+	5	26-92
CD34+/CD7+	12	11-88
CD34+/CD10+	1	22
CD34+/CD19+	2	24-65
CD117+/CD2+	5	13-91
CD117+/CD7+	11	18-90
CD117+/CD10+	1	17
CD117+/CD19+	2	15-53
CD34+/Glycophorin A+	0	0
CD117+/Glycophorin A+	1	30
Asynchronous antigen expression (n = 146)		
CD34+/CD11b+	11	11-80
CD34+/CD14+	0	0
CD34+/CD15+	20	10-36
CD34+/CD56+	5	29-84
CD34+/CD64+	6	10-49
CD34+/CD65+	15	11-63
CD117+/CD11b+	10	12-62
CD117+/CD14+	0	0
CD117+/CD15+	25	10-55
CD117+/CD56+	6	11-80
CD117+/CD64+	9	11-70
CD117+/CD65+	22	10-62
CD33+/CD15+	2	80-94
CD33+/CD64+	5	18-97
CD33+/CD65+	5	10-99
CD33+/CD11b+	3	20-26
CD33+/CD56+	2	10-78
Lack of lineage-specific antigen (n = 14)		
CD33++/CD13–	5	93-99
CD33–/CD13++	9	25-98

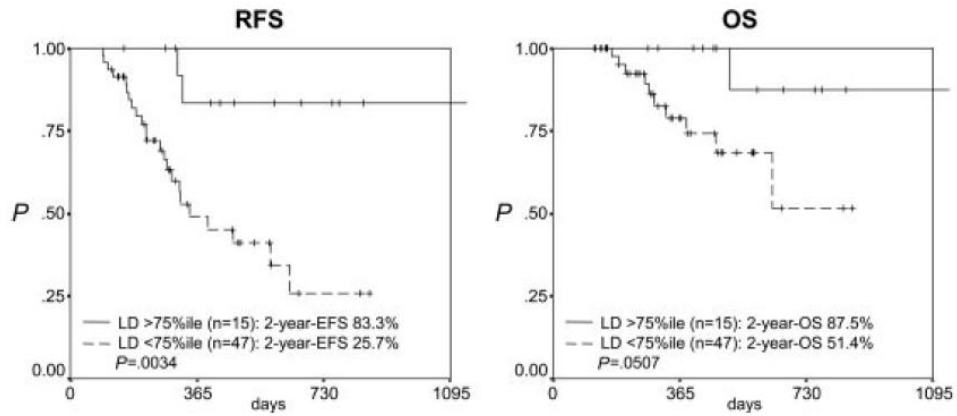
AML, acute myeloid leukemia; LAPs, leukemia-associated phenotypes; +, positive; ++, strong positive; –, negative.

Al-Mawali et al. American Journal of Clinical Pathology 2009

Post-induction



Post-consolidation



Kern et al. Blood. 2004

⇒ Suivi de la MRD en CMF plus informatif sur la survie globale en post-consolidation

⇒ Quel point de suivi réalisé en CMF?

LAM et CMF

En pratique:

MRD en CMF = stratification des patients à risque de rechute ou d'échec

Les LAIP doivent être identifiés au diagnostic+++ / panels d'Ac standardisés

MRD est un facteur pronostic majeur chez l'adulte et l'enfant

Sensibilité 10^{-4}

Moins sensible et spécifique que la biologie moléculaire (RQ-PCR)

Mais applicable à tous les patients (contre environ 50% pour la biologie moléculaire)

Perspectives:

Déterminer les meilleurs LAIP pour le suivi de la MRD (stabilité dans le temps)

Déterminer le seuil cliniquement informatif (valeur pronostique)

Déterminer le meilleur point de suivi, le plus informatif concernant le pronostic

Notion de rémission complète à redéfinir…

Leucémie aiguë lymphoïde (LAL)

MRD

Suivi de la MRD **validé** dans les LAL, intégré dans les protocoles thérapeutiques

CMF = facteur pronostic

CMF = adaptation de l'attitude thérapeutique

Point de suivi	**Niveau MRD MO**	**Signification pronostique Conséquences thérapeutiques**
Post-induction	>1% (10^{-2})	Très mauvais prono => intensification si post-conso+*
	<0,01% (10^{-4})	Très bon => DESCALADE**
Post-consolidation	>0,1% (10^{-3})	Mauvais => intensification puis allogreffe*
Post-intensification	>0,1% (10^{-3})	Risque majeur de rechute post-allogreffe*

* FRALLE 2000 (Fr), EORTC (Fr)

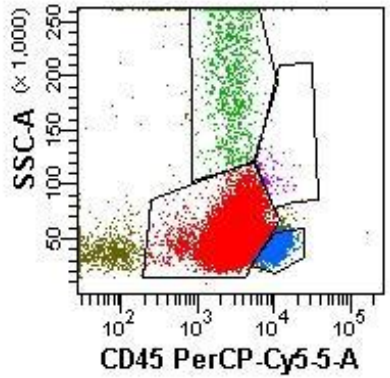
** POG (USA), BFM (All)

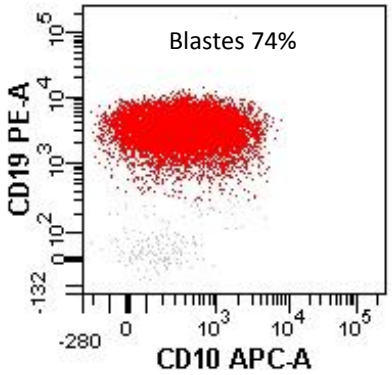
Outil pronostique majeur

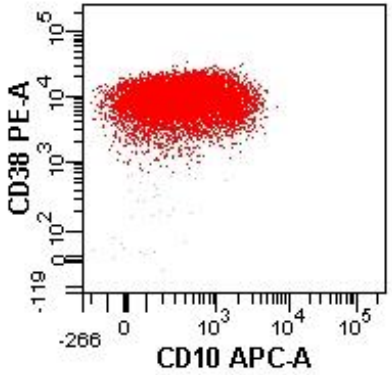
Guide les choix thérapeutiques, dans la plupart des protocoles actuels, SELON le NIVEAU de MRD

Diagnostic

Le 02/12/2008

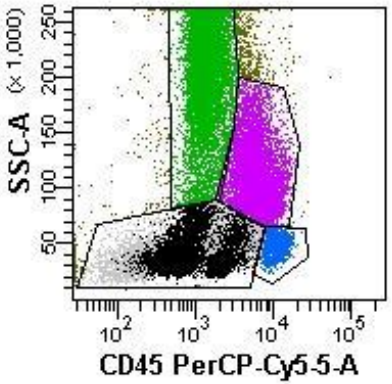


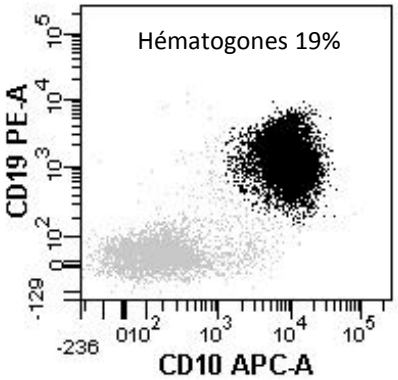


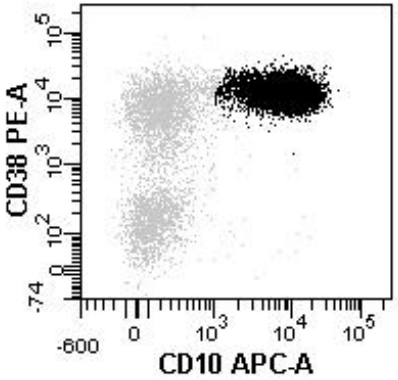


MRD négative

Le 28/04/2009

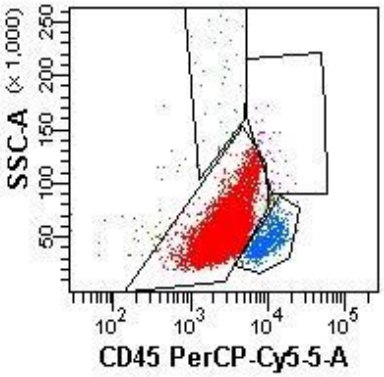


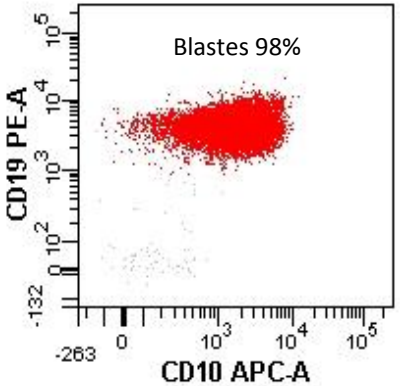


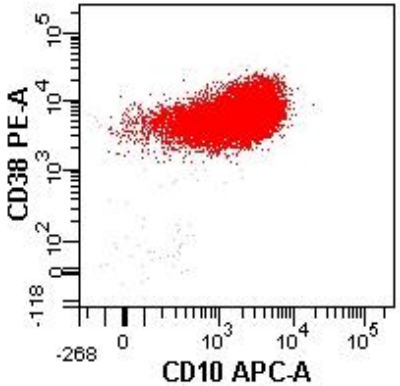


Rechute

Le 05/10/2009

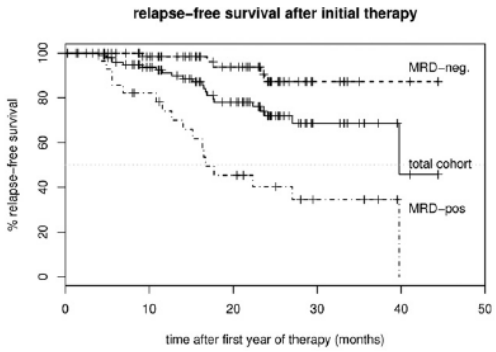






Leucémie aiguë lymphoïde (LAL)
MRD

Caractéristiques	Réarrangement Ig/TCR RQ-PCR	Transcrit de fusion RQ-PCR	Cytométrie en flux
Sensibilité	10^{-4} – 10^{-5}	10^{-4} – 10^{-6}	3-4 couleurs: 10^{-3} – 10^{-4} 6-9 couleurs: 10^{-4} – 10^{-5}
Applicabilité	90%-95%	30-40%	>95%
Avantages	- Sensibilité - Standardisation - Outil validé pour la stratification des patients - Stabilité de l'ADN	- Sensibilité - Stabilité du marqueur au cours du traitement - Rapide - Peu cher	- Outil de suivi pour la quasi-totalité des patients - Rapide - Information supplémentaire: • sur les cellules normales (hématogones) • Sur les cellules pathologiques - Standardisation en cours (EuroFlow)
Inconvénients	- Temps technique+++ - Stabilité du marqueur: évolution clonale - Expertise importante - Coût	- Seulement 1 patient sur 3 bénéficie de ce suivi - Standardisation nécessaire - ARN instable	- Stabilité des LAIP - Peu de cellules post-induction - Relativement cher - Si 3-4 couleurs: manque de sensibilité - Si 6-9 couleurs: expertise nécessaire+++



Bruggemann. Seminars in Oncology. 2012

Leucémie lymphoïde chronique (LLC)
MRD

Syndrome lymphoprolifératif chronique:

Immunophénotype *caractéristique* => CMF

Absence d'anomalie moléculaire

Clone lymphoïde => réarrangement IGH

Méthodes possibles de suivi de la MRD:

CMF

Biologie moléculaire: réarrangement IGH

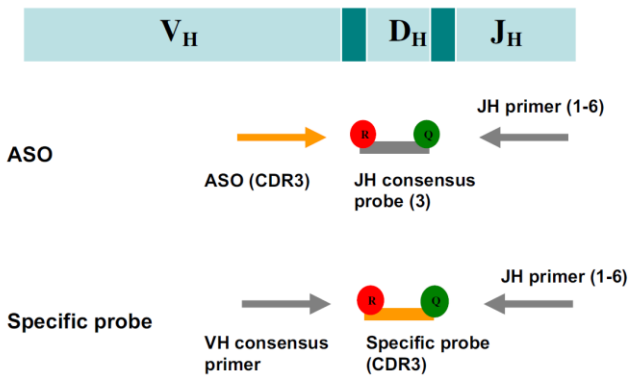
Traitement donnant des réponses de plus en plus profondes (apport des anti-CD20)

Quid de la définition de la rémission complète?

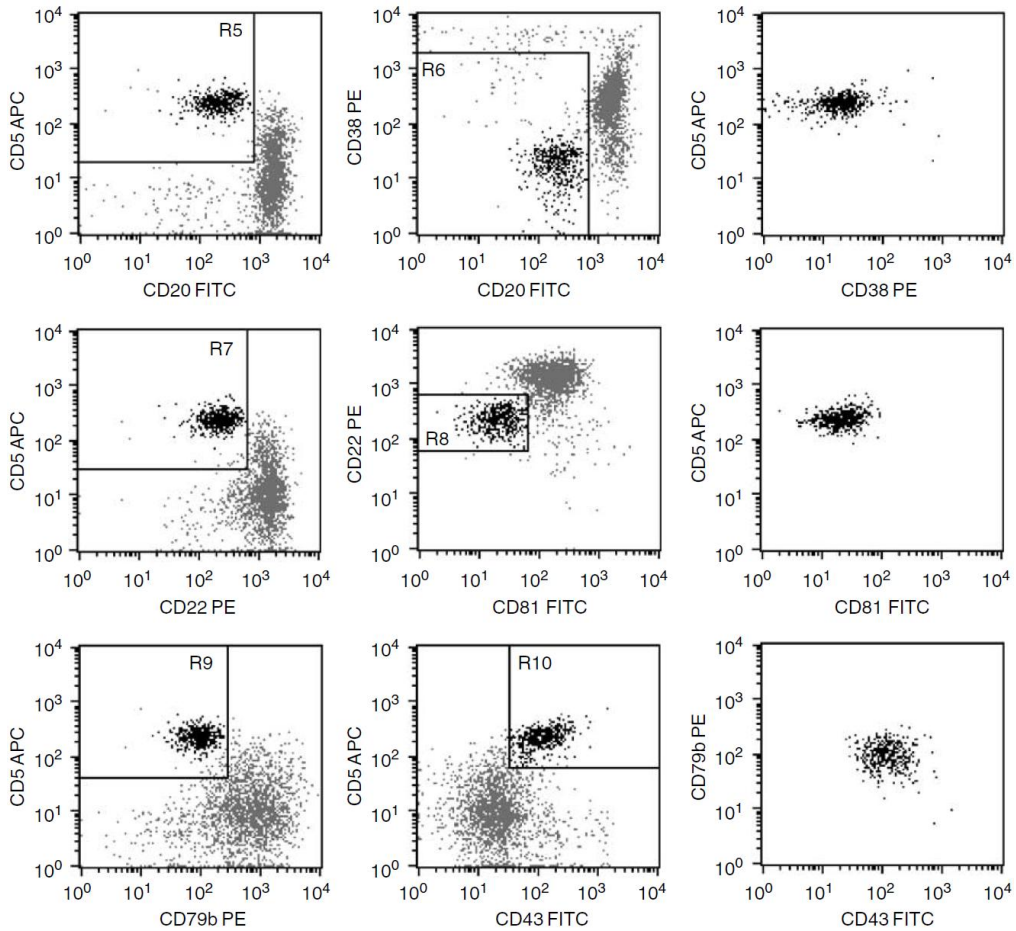
=> intérêt +++ du suivi de la MRD

Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Réarrangement IGH et CMF



Moreno et al. Best Practice & Research Clinical Haematology. 2010



Rawstrom. Leukemia. 2007

MRD dans la LLC

Où en est-on?

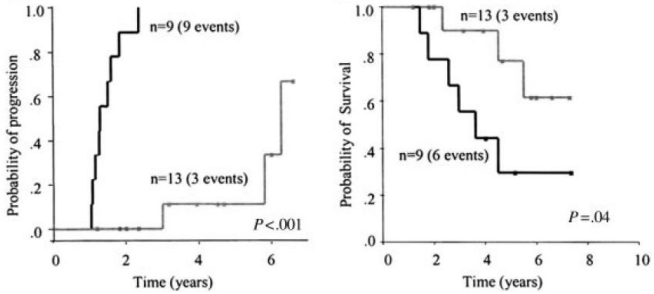
Etat des lieux:

Grande variabilité en termes de sensibilité et spécificité des différentes techniques de suivi de la MRD

Méthodes quantitatives: ASO IGHV-PCR et CMF

MRD négative définie arbitrairement si MRD < 10^{-4}

Corrélation MRD négative avec une meilleure PFS et une meilleure OS



Après autogreffe
Moreno et al. Blood. 2010

Perspectives:

Essai randomisé utilisant la MRD

Adaptation du traitement en fonction de la MRD

Signification des la MRD négative chez les patients avec syndrome tumoral résiduel

Combien de couleurs en CMF (6-8 versus 4 couleurs) ?

Syndrome lymphoprolifératif chronique (SLPC)

MRD

Myélome

Réarrangement IGH

Lymphome folliculaire

Réarrangement IGH
BCL2-JH

Lymphome du manteau

Réarrangement IGH
BCL1-JH

Leucémie à tricholeucocytes

Réarrangement IGH
Perspectives: RQ-PCR sur BRAF V600E

Myélome

MRD

Suivi MRD possible dans le myélome

⇒ Réarrangement IGH

Author	Marker	Method	Sample assessed	Evaluable patients	Patients status	Therapeutic regimen	PFS MRD (negative versus positive)[a]	*p*-value
Swedin *et al.*, *BJH* 1998	IGHV	N-PCR	BM, harvest	24	Diagnosis	ASCT	60%/47% (2 y FU)	nd
Corradini *et al.*, *JCO* 1999	IGHV	N-PCR	BM, harvest	29	Diagnosis or relapsed	ASCT (15 patients) Allo-SCT (14 patients)	78%/47% (3 y FU)	nd
Martinelli *et al.*, *JCO* 2000	IGHV	N-PCR	BM	44	Diagnosis or relapsed	ASCT (30 patients) Allo-SCT (14 patients)	110 m/35 m	<0.005
Chiusolo *et al.*, *Ann Hematol* 2001	IGHV	N-PCR	BM harvest	21	Diagnosis or relapsed	ASCT	nd	nd
Corradini *et al.*, *Blood* 2003	IGHV	N-PCR	BM	48	Diagnosis or relapsed	Allo-SCT	75%/50% (5 y FU)	nd
Bakkus *et al.*, *BJH* 2004	IGHV	RQ-PCR[a]	BM	60	Diagnosis	ASCT	64 m/16 m[a]	0.01
Galimberti *et al.*, *Leuk Res* 2005	IGHV	N-PCR	BM	20	Diagnosis or relapsed	ASCT + Allo-SCT	76%/34% (2 y OS)	0.03
Putkonen *et al.*, *EJH* 2010	IGHV	RQ-PCR[a]	BM	37	Diagnosis or relapsed	ASCT (30 patients) Allo-SCT (7 patients)	70 m/19 m[a]	0.003
Ladetto et al. *JCO* 2010	IGHV	N-PCR RQ-PCR[a]	BM	37	Diagnosis	ASCT + VTD consolidation	100%/57% (3.5 y FU)[a]	<0.001

Abbreviations: MRD, minimal residual disease; MM, multiple myeloma; PFS, progression-free survival; IGHV, immunoglobulin heavy chain; N-PCR, nested PCR; RQ-PCR, real-time Quantitative PCR; BM, bone ,marrow; ASCT, autologous stem cell transplantation-based program; allo-SCT, allogeneic stem cell transplantation-based program; m, months; y, years; FU, follow-up; nd, not determined due to the small sample size; VTD, bortezomib, thalidomide and dexamethasone; OS, overall survival.
[a]The sensitivity of RQ-PCR is lower than N-PCR.

Ferrero. Hematological Oncology. 2011

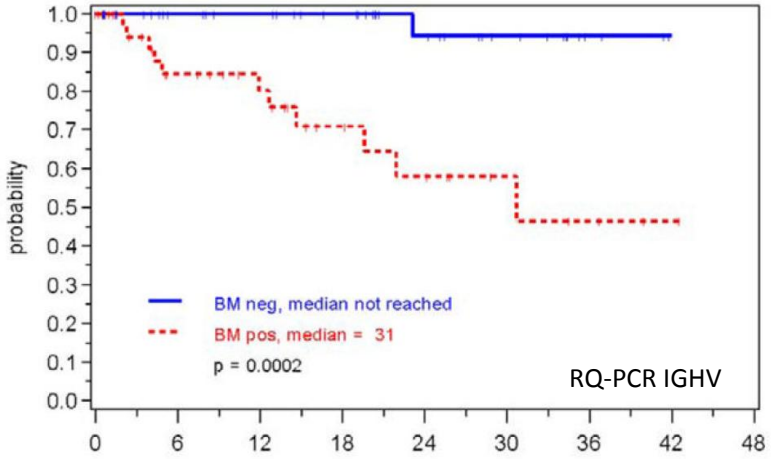
Lymphome du manteau

MRD

Suivi MRD:

⇒ Réarrangement IGH

⇒ BCL1-JH



Pott et al. Blood. 2010

Author	Marker	Method	Sample assessed	Evaluable patients	Patients status	Therapeutic regimen	PFS MRD (negative versus positive)[a]	*p*-value
Howard *et al.*, *JCO* 2002	BCL-1, *IGHV*	N-PCR	PB, BM	25	Diagnosis	R-CHOP	17 m/19 m	ns
Corradini *et al.*, *JCO* 2004	BCL-1 *IGHV*	N-PCR	PB, BM, harvest	25	Diagnosis or relapsed	ASCT	nd	nd
Pott *et al.*, *Blood* 2006	*IGHV*	RQ-PCR[a]	PB, BM, harvest	27	Diagnosis	TBI + ASCT + rituximab[b]	92 m/21 m[a]	<0.001
Geisler *et al.*, *Blood* 2008	BCL-1, *IGHV*	N-PCR	PB, BM	79	Diagnosis	R-HD araC + R-ASCT	nr/18 m	<0.001
Pott *et al.*, *Blood* 2010	BCL-1, *IGHV*	RQ-PCR[a]	PB, BM, harvest	190	Diagnosis	R-CHOP + TBI + R-ASCT versus R-CHOP/R-DHAP + R-HD araC + TBI + R-ASCT (109 patients)	94%/74% (2 y FU)[a]	0.022
						R-FC versus R-CHOP (81 patients)	77%/34% (2 y FU)[a]	0.021

MRD, minimal residual disease; MCL, mantle cell lymphoma; PFS, progression-free survival; IGHV, immunoglobulin heavy chain; N-PCR, nested PCR; RQ-PCR, real-time quantitative PCR; PB, peripheral blood; BM, bone marrow; R-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorucin, vincrisine and prednisone; ASCT, autologous stem cell transplantation; TBI, total body irradiation; R-HD araC, rituximab-supplemented high-dose citarabine program; R-DHAP, rituximab, dexamethasone, citarabine and cisplatinum; R-FC, rituximab, fludarabine and cyclophosphamide; m, months; nd, not determined because of the small sample size; nr, not reached; y, years; FU, follow-up; ns not statistically significant.

[a]The sensitivity of RQ-PCR is lower than N-PCR

[b]Nearly half of the patients received rituximab

Ferrero. Hematological Oncology. 2011

Lymphome folliculaire

MRD

Suivi MRD:

⇒ Réarrangement IGH

⇒ BCL2-JH

Author	Marker	Method	Sample assessed	Evaluable patients	Patients status	Therapeutic regimen	PFS MRD (neg vs pos)*	p value
Gribben et al, NEJM 1991[1]	BCL2	N-PCR	Harvest	114	Relapsed	TBI + ASCT + anti-B cell ex vivo purging	95%/61% (2y FU)	<0.001
Hardingham et al, JCO 1995	BCL2, IGH	N-PCR	PB, BM, harvest	24	Relapsed	ASCT	67%/13% (3y FU)	0.02
Moos et al, Leukemia 1998	BCL2	N-PCR	PB, BM, harvest	47	Diagnosis or relapsed	ASCT	100%/59% (2y FU)	0.005
Lopez-Guillermo et al, Blood 1998	BCL2	N-PCR	PB	40	Diagnosis	Polychemotherapy +/- RT	76%/38% (4y FU)	<0.001
Freedman et al, Blood 1999[1]	BCL2	N-PCR	Harvest	113	Relapsed	TBI + ASCT + anti-B cell ex vivo purging	83%/19% (8y FU)	<0.001
Apostolidis et al, JCO 2000	BCL2	N-PCR	BM, harvest	53	Relapsed	TBI + ASCT + anti-B cell ex vivo purging	nd	nd
Mandigers et al, Blood 2001	BCL2	RQ-PCR*	PB	28	Relapsed	CVP + INF	No differences observed*	ns
Ladetto et al, Blood 2002[2]	BCL2, IGH	N-PCR	BM, harvest	42	Diagnosis	ASCT	90%/48% (3y F)	<0.001
Rambaldi et al, Blood 2002	BCL2	N-PCR	PB, BM	77	Diagnosis	R-CHOP	57%/20% (3y FU)	<0.001
Corradini et al, JCO 2004	BCL2, IGH	N-PCR	PB, BM, harvest	35	Diagnosis or relapsed	ASCT	71%/40% (6y FU)**	<0.025
Ladetto et al, Leukemia 2006[2]	BCL2, IGH	N-PCR	BM, harvest	42	Diagnosis	ASCT	85%/41% (6y FU)	<0.001
Brown et al, BBMT 2007[1]	BCL2	N-PCR	Harvest	70	Relapsed	TBI + ASCT + anti-B cell ex vivo purging	67%/26% (12y FU)	0.001
Ladetto et al, Blood 2008	BCL2, IGH	N-PCR	BM	60	Diagnosis	R-ASCT vs R-CHOP	78%/25% (4y FU)	<0.001
Hirt et al, BJH 2008	BCL2, IGH	RQ-PCR*	PB	43	Diagnosis	R-.MCP vs MCP	nr/27m	0.02
Goff et al, JCO 2009	BCL2	RQ-PCR*	PB	127	Diagnosis	Polychemotherapy +/- ^{90}Y consolidation	41m/24m	<0.01
van Oers et al, JCO 2010	BCL2	RQ-PCR*	PB, BM	108	Relapsed	CHOP +/- R maintenance	46%/40% (3y FU)*	ns

Abbreviations: MRD, minimal residual disease; FL, follicular lymphoma; PFS, progression-free survival; IGH, immunoglobulin heavy chain; N-PCR, nested PCR; RQ-PCR, real time Quantitative PCR; PB, peripheral blood; BM, bone marrow; TBI, total body irradiation; ASCT, autologous stem cell transplantation-based program +/- R, rituximab; RT, radiotherapy; CVP, cyclophosphamide, vincristine and prednisone; INF, interferon α-2b; R-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vinscristine and prednisone; MCP, mitoxantrone, chlorambucil and prednisolone +/- R, rituximab; ^{SD}Y, ^{SD}Y ibritumomab tiuxetan; m, months; nd, not determined due to small sample size; nr, not reached; y, years; FU, follow-up; ns, not statistically significant.

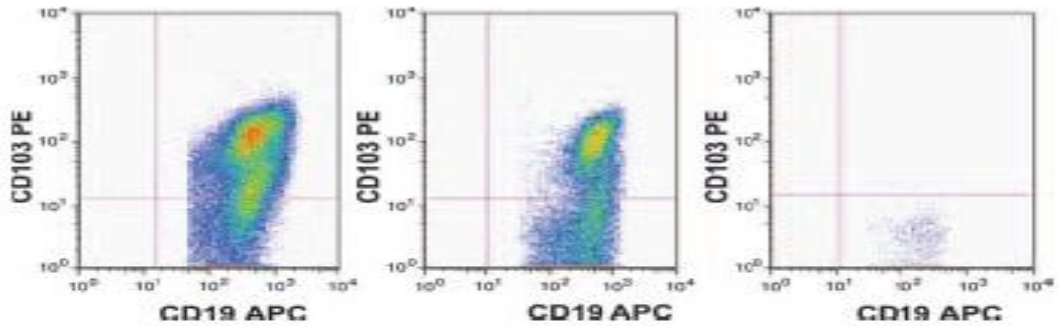
[1-2]These studies report MRD follow-up of the same patients series; *The sensitive of RQ-PCR is lower than N-PCR; **FL and MCL patients pooled.

Ferrero. Hematological Oncology. 2011

Leucémie à tricholeucocytes (HCL)

MRD

CMF
CD19^{+}
CD103^{+}
CD11c^{+}
CD25^{+}
CD123^{+}



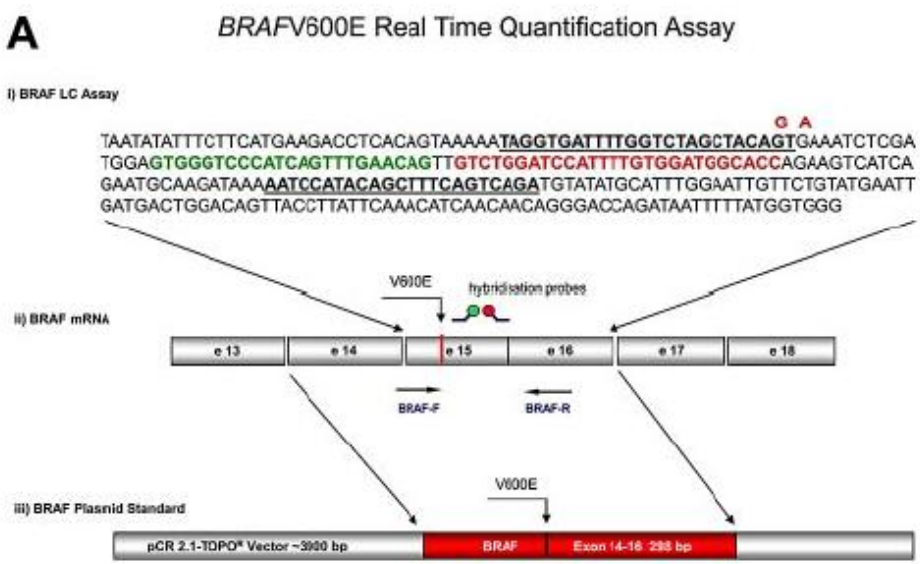
Diagnostic
HCL=11%

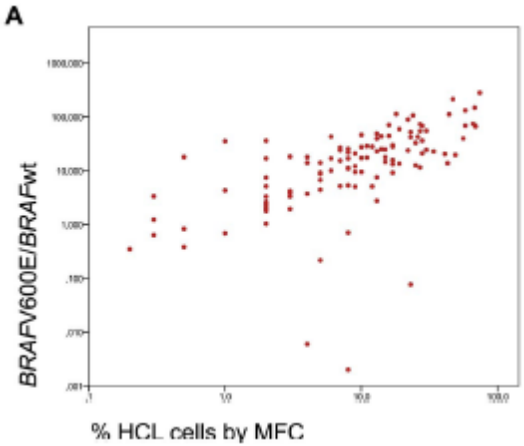
J30 (2cda)
HCL=10%

J90 (+ritux)
HCL < 1/200 000

Ravandi. Blood. 2006

RQ-PCR
BRAF V600E





Schnittger. Blood. 2012

Synthèse

HEMOPATHIE MALIGNE

AVEC transcrit spécifique

BCR-ABL : t(9;22) dans LMC et LAL-B
TEL-AML1 : t(12;21) dans LALB
AF4-MLL : t(4;11) dans LAL
AML1-ETO : t(8;21) dans LAM
CBFβ-MYH11 : inv16 dans LAM
PML-RARα : t(15;17) dans la LAP
SIL-TAL : délétion, dans LAL-T

SANS transcrit spécifique

Clonalité
B ou T
(LAL, lymphomes)

CMF
(LAM, LAL)

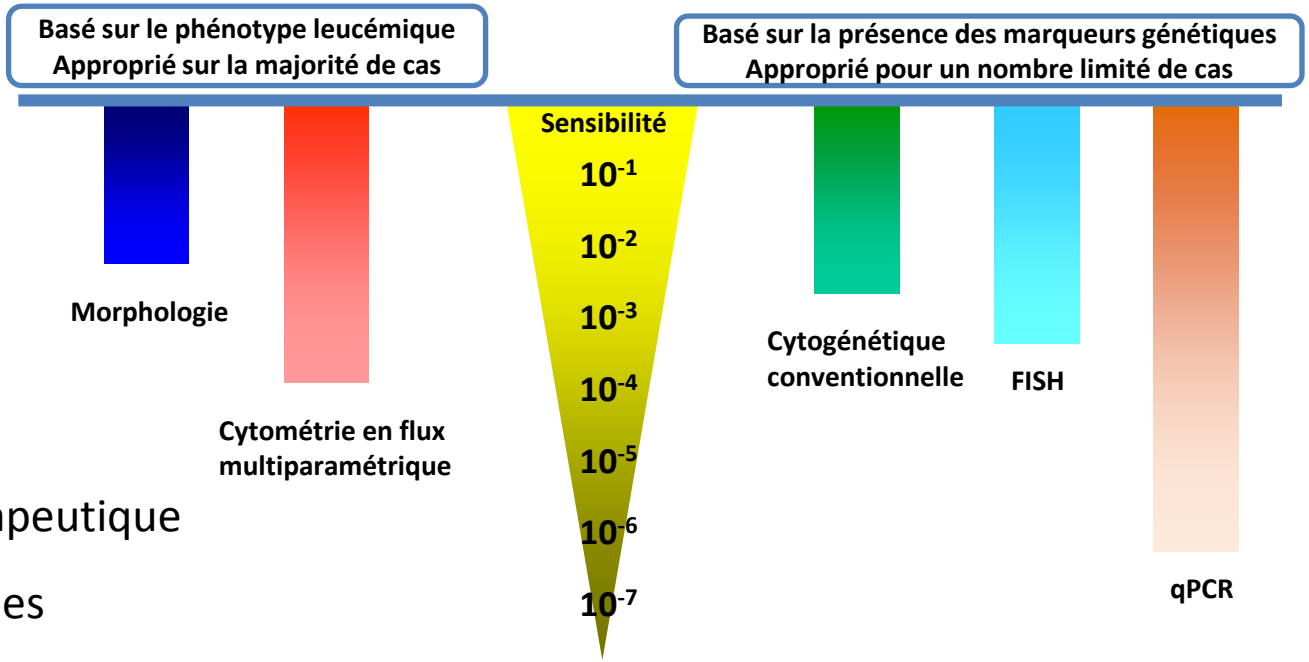
Cytogénétique
(caryotype et FISH)

Conclusion

MRD

Utilisation de techniques souvent lourdes et coûteuses

Techniques à adapter en fonction du marqueur tumoral à suivre et de la sensibilité requise



OBJECTIFS

Evaluation efficacité thérapeutique

Adaptations thérapeutiques

Prédiction des patients à risque

Anticipation des rechutes

Perspectives

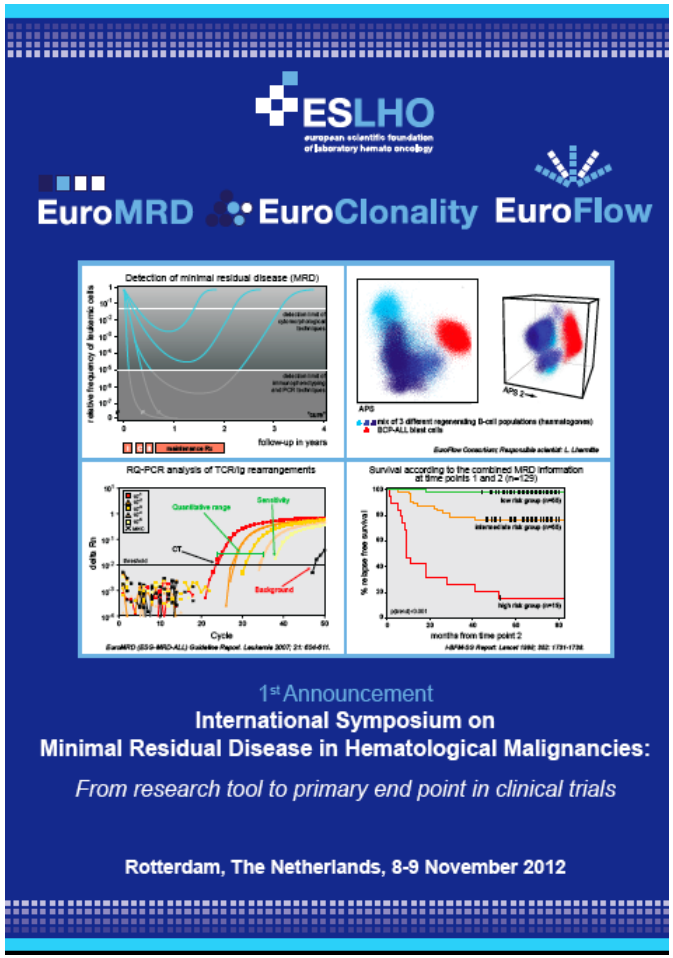
Améliorer les techniques existantes

Recherche de nouveaux marqueurs utilisables pour le suivi de la MRD

- Exemple:
  - BRAF V600E dans la leucémie à tricholeucocytes
  - Nombreux marqueurs potentiels dans la LAM

Standardiser les procédures entre les différents laboratoires:

- Intérêt pour les protocoles cliniques multicentriques +++

Merci pour votre attention

Pour aller plus loin…