

ÉTUDE MRD-ALLO-MDS

Evaluation de la maladie résiduelle des patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques pour un syndrome myélodysplasique ou une leucémie myélomonocytaire chronique

Le numéro d'identification de la recherche biomédicale (n°ID-RCB) : **2025-A00381-48**

Investigateur Coordonnateur

Marie Robin
Hôpital Saint-Louis, Paris, Université de Paris Cité
1 avenue Claude Vellefaux
75010 Paris

Coordinateur des études biologiques

PREUDHOMME Claude
Service d'hématologie Cellulaire Centre de Biologie – Pathologie
Boulevard du Pr J. LECLERC
59037 LILLE Cedex

Etude Statistique

Ariane Boumendil

Promoteur

Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM)

Soutien

Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC)



1) Introduction et état de la question posée

Les importantes avancées thérapeutiques des dernières années, incluant le recours croissant à l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ASCT) ainsi que l'expérience acquise dans certaines hémopathies malignes comme les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), ont fait de la surveillance moléculaire un outil potentiellement intéressant pour prédire l'évolution et démontrer l'efficacité du traitement chez les patients atteints de syndromes myélodysplasiques (SMD). L'importante hétérogénéité génétique des SMD a cependant rendu difficile l'établissement de recommandations concernant le type de marqueur, la technologie ou le moment optimal de cette évaluation.

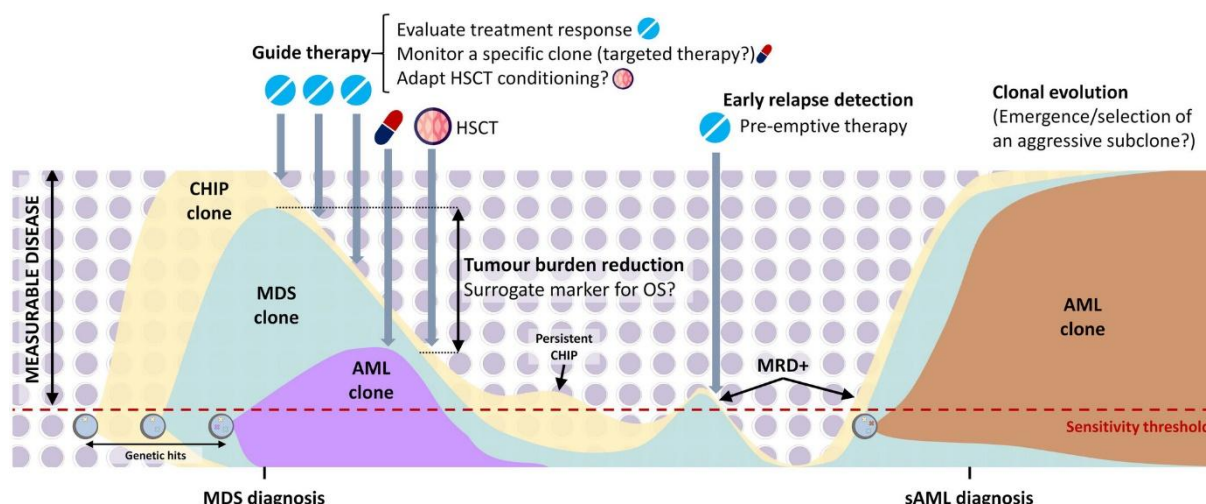


Figure 1 : Vue d'ensemble des contributions potentielles de la surveillance moléculaire par NGS dans l'histoire naturelle des SMD (Duployez N & Preudhomme C. Monitoring molecular changes in the management of myelodysplastic syndromes. Br J Haematol. 2024 Jun 27; PMID: 38934371).

Les caractéristiques d'un marqueur approprié doivent inclure la spécificité, la sensibilité et la stabilité dans le temps. Ainsi, la plupart des transcrits de fusion et des mutations *NPM1*, qui par définition confirment le diagnostic de LAM, répondent à ces critères et sont devenus les marqueurs de choix dans les LAM de novo. Dans les SMD (et LAM secondaires), cela est rendu difficile par l'hétérogénéité des profils mutationnels, l'absence ou quasi-absence de transcrits de fusion ou de mutations récurrentes, nécessitant des marqueurs et des méthodes alternatifs. Si au moins une mutation génétique peut être détectée dans plus de 90 % des cas, en considérant une liste d'environ 50 gènes récurrents, la plupart des gènes sont individuellement affectés chez moins de 10% des patients.¹ De plus, un défi particulier dans une population principalement composée de patients âgés est la distinction difficile entre le SMD résiduel et la présence potentielle d'une hématopoïèse clonale coexistant avec des marqueurs moléculaires similaires. Dans ce contexte, le séquençage à haut débit ou séquençage de nouvelle génération (NGS) se révèle être un outil intéressant permettant la détection et la quantification simultanées (voire exhaustives) de tous les variants génétiques de la maladie (Figure 1) et d'inférer la hiérarchie clonale en cas de prélèvements répétés.¹

Le suivi moléculaire des SMD après ASCT :

Certaines études ont pu montrer que la détection ou réémergence d'un marqueur de MRD était associée à une incidence plus élevée de rechute et à un pronostic plus sombre après ASCT dans les SMD.² Néanmoins ces données sont essentiellement issues de cohortes hétérogènes (en termes d'hémopathies et de prise en charge) étudiées par NGS standard dont la sensibilité est limitée (10^{-2}). En utilisant du séquençage avec barcodes moléculaires (*unique molecular identifiers*, UMI), Duncavage

et al. ont montré que les patients allogreffés pour un SMD avec des mutations détectables (seuil de sensibilité à 5.10^{-3}) dans la moelle osseuse au jour 30 ou au jour 100 après une ASCT avaient un risque de progression significativement plus élevé (hazard ratio au jour 30 : 4.48 [IC 95 %, 2.21-9.08] ; $p < 0.001$ en analyse multivariée) et un taux de survie sans progression plus faible que ceux chez qui ces mutations n'étaient pas détectées (hazard ratio au jour 30 : 2.39 [IC 95 %, 1.40-4.09] ; $p = 0.002$).³ Dans une autre étude utilisant la PCR digitale (ddPCR) pour surveiller plusieurs mutations (identifiées précédemment par NGS au diagnostic) après ASCT, Tobiasson et al. ont également démontré que la positivité de la MRD, à tout moment, était fortement associée à une survie globale plus courte et une survie sans rechute. Il y avait une association entre le seuil pour considérer la positivité et le pronostic avec une incidence cumulative estimée de la rechute après la première positivité de la MRD étant de 41 %, 55 % et 63 % lorsqu'on utilisait respectivement 0.1 %, 0.3 % et 0.5 % de fréquence allélique comme seuils.⁴ Bien qu'offrant une excellente sensibilité, la ddPCR requiert néanmoins le design de sondes spécifiques par échantillon, rendant son utilisation difficile pour la pratique clinique. Récemment, nous avons également confirmé, sur une petite cohorte de patients, que le statut moléculaire et le suivi de la MRD par ddPCR étaient fortement corrélés à l'évolution post-transplantation.⁵

Plus que dans d'autres contextes, la surveillance moléculaire des SMD semble particulièrement pertinente dans le contexte d'ASCT car elle permet des mesures préventives (modulation de l'immunosuppression, infusions de lymphocytes du donneur et/ou agents hypométhylants).^{6,7} Ces procédures ont démontré une plus grande efficacité lorsqu'elles sont initiées alors que la charge tumorale est encore faible (c'est-à-dire en cas de rechute moléculaire uniquement), soulignant la nécessité d'une surveillance MRD sensible, fiable et fréquente permettant une intervention avant une rechute manifeste.^{6,8} En particulier, dans l'étude de Tobiasson et al., les rechutes étaient précédées par une MRD positive avec une médiane de 71 jours entre la première MRD positive et la rechute clinique, offrant une fenêtre d'opportunité pour des thérapies préventives.⁴

Son utilisation répétée au cours du suivi pourrait fournir une estimation fiable de la réduction de la charge tumorale avant et pendant le traitement⁹, de permettre la détection précoce des rechutes, d'anticiper la progression vers une LAM secondaire et, finalement de faciliter les ajustements thérapeutiques (ajout de thérapies ciblées, traitement préventif des rechutes moléculaires, adaptation du régime de conditionnement avant une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques) (Figure 1).¹

2) Objectif principal

- Étudier l'association entre la détection d'une maladie résiduelle (MRD) et la rechute

3) Objectifs secondaires

- Analyser l'impact d'une MRD positive sur la survie
- Déterminer l'impact du seuil de détection sur le risque de rechute
- Chez les patients sans maintenance planifiée : identifier le seuil de MRD correspondant à un taux de rechute à six mois supérieurs à 50%
- Analyser la cinétique de la MRD chez les patients avec ou sans maintenance précoce

- Analyser l'impact de la GVHD sur la MRD et la rechute
- Analyser le rôle des lymphocytes du donneur sur la rechute

4) Critères de jugement

Principal :

-rechute de l'hémopathie maligne définie par la détection de la maladie au niveau de la moelle osseuse (définie par IWG 2006, Blood (2006) 108 (2): 419–425).

Secondaires :

- survie globale (OS) : définie (selon les analyses) comme le délai entre la date de greffe (ou la date d'évaluation de la MRD) et le décès. Les patients vivants sont censurés à la date de dernière nouvelle
- survie sans maladie (DFS) : définie (selon les analyses) comme le délai entre la date de greffe (ou la date d'évaluation de la MRD) et la rechute ou le décès. Les patients vivants sans rechute sont censurés à la date de dernière nouvelle
- mortalité sans rechute
- GVHD aiguë grade 1 à 4 et GVHD chronique comme définie dans le registre EBMT (www.ebmt.org)

5) Données du registre EBMT utilisées pour l'analyse

Variables descriptives :

Age et sexe du patient

Caractéristique de la maladie, classification WHO 2022, IPSS révisé

Score de comorbidité et antécédents non hématologique avant la greffe

Numération au diagnostic et à la greffe

Blastes médullaires au diagnostic et à la greffe

Cytogénétique au diagnostic et à la greffe

Biologie moléculaire au diagnostic et à la greffe

Traitement de l'hémopathie avant la greffe

Statut de la maladie à la greffe

Conditionnement et prophylaxie de la GVHD

Type de donneur et appariement HLA

Age et sexe du donneur

Source de cellules du greffon

Endpoints après la greffe :

Neutrophiles > 0.5G/L et la date

Plaquettes > 20G/L et la date

Rejet de greffe et date

Prise de greffe et date

GVHD aigue ou chronique grade et date

Rechute de l'hémopathie maligne et date

Injection de lymphocytes du donneur et date

Traitement de l'hémopathie maligne en post-greffe

Date des dernières nouvelles

Statut aux dernières nouvelles (vivant, décédé)

Cause de décès

6) Critères d'inclusion

- Patient âgé de 18 ans ou plus
- Patient greffé pour syndrome myélodysplasique (SMD) ou leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)
- Tout type de greffe, de donneur et de conditionnement
- Affiliation à régime de sécurité sociale

7) Critères d'exclusion

- Patient refusant l'étude
- Patient refusant l'enregistrement de ses données cliniques dans le registre EBMT
- Patient sous tutelle ou sous sauvegarde de justice

8) Recrutement des patients

-les patients remplissant les critères d'inclusion et d'exclusion allogreffés dans les centres participant à l'étude et qui ne s'opposent pas à l'étude (formulaire de non opposition)

9) Déroulement de l'étude

Les patients éligibles sont inclus avant leur allogreffe et acceptent le protocole. Si les patients ont déjà eu un NGS pré greffe dans le cadre du soin (en particulier au CHRU de Lille) ou si un échantillon de sang permettant l'extraction d'ADN a été collecté en pré-greffe, ils peuvent être inclus après la greffe, il est préférable de contacter l'investigateur dans ces situations pour vérifier la faisabilité.

Points de prélèvement sanguin (2 tubes de sang sur EDTA de 5 ml) :

- Avant la greffe (entre 60 et 5 jours avant la greffe)
- J30 +/-5 jours post allogreffe
- J60 +/-5 jours post allogreffe
- J100 +/- 10 jours post allogreffe

- 6 mois +/-15 jours mois post allogreffe
- 9 mois +/-15 jours mois post allogreffe
- 12 mois +/- 1 mois post greffe

Ces points correspondent à des points de prélèvement dans le cadre du soin de routine lors d'HDJ ou de consultations prévues, aucun prélèvement supplémentaire n'ait prévu. Une tolérance est prévue pour les dates (cf ci-dessus). Les échantillons sont stockés au laboratoire du CHRU de Lille avant de pouvoir être analysés avant la fin de l'étude.

Aucun autre examen n'est prévu.

Les données cliniques sont recueillies dans le registre EBMT local des centres participant conformément à la réglementation en vigueur. Elles incluent les données maladie et greffe.

10) Analyse biologique

Séquençage à haut débit adapté à la maladie résiduelle (NGS-MRD) : L'analyse sera réalisée à partir d'ADN génomique extrait selon les procédures standards. Pour chaque échantillon, quatre réplicats d'ADN de 200 ng seront préparés selon la même méthodologie. Les librairies seront préparées selon le protocole Twist® V2, incluant l'utilisation des UMI-DUPLEX et séquencées sur un NovaSeq 6000 (Illumina®) en 2 × 150 paires de bases. Le séquençage sera réalisé avec un panel à façon de 34 gènes sélectionnés pour leur récurrence et informativité dans les SMD (*ASXL1*, *BCOR*, *BRAF*, *CALR*, *CBL*, *CEBPA*, *DDX41*, *DNMT3A*, *EZH2*, *FLT3*, *GRM1*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KRAS*, *MPL*, *NF1*, *NPM1*, *NRAS*, *PPM1D*, *PTPN11*, *RIT1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *UBA1*, *UBTF*, *WT1*, *ZRSR2*) ainsi que 16 régions polymorphiques d'intérêt permettant l'identitovigilance (*ABCB11*, *COG1*, *EVC*, *FERMT1*, *L2HGDH*, *LAMA3*, *NDUFV3*, *NPHS2*, *SLC12A6*, *SOX6*, *SRY*, *TDRD7*, *VCAN*, *WNK1*). Les régions d'intérêt seront séquencées avec une profondeur moyenne de 120 000 X (reads consensus). Les polymorphismes issus du receveur seront également utilisés pour estimer le chimérisme après transplantation (Figure 2).

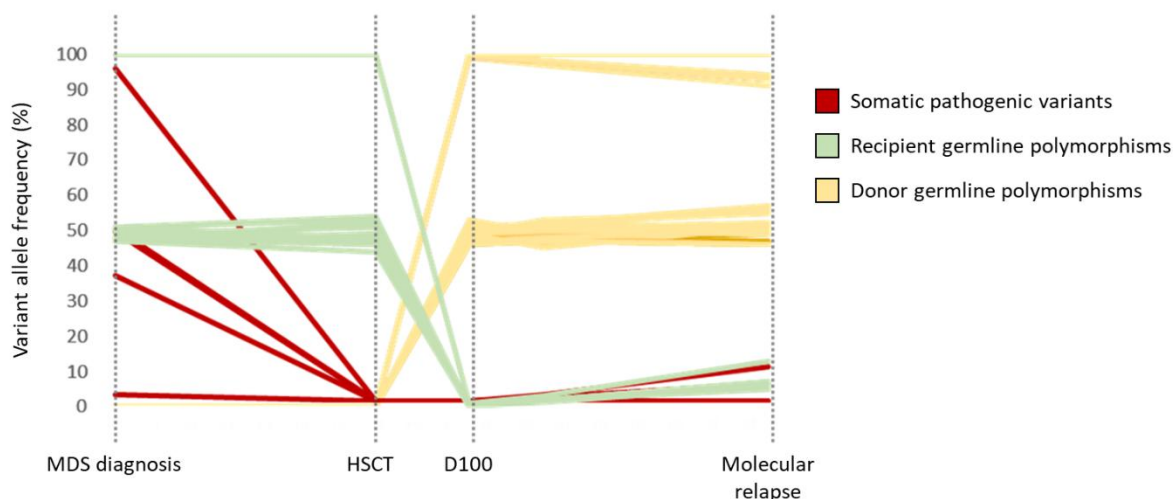


Figure 2 : Exemple du suivi moléculaire d'un patient atteint de SMD allogreffé. L'évolution des ratios alléliques des mutations (rouge), des polymorphismes du receveur (vert) et du donneur (jaune) sont indiqués.

Analyse bio-informatique : Le démultiplexage des données avec extraction des duplex UMI sera effectué avec bcl-convert (v4.2.4). Les fichiers FASTQ seront trimmés avec fastp (v0.20.0). Les FASTQ trimmés seront alignés et dédupliqués à l'aide de la suite d'outils DRAGEN (v4.2) en fixant à 2 reads le

nombre minimal de lectures pour produire un duplex consensus. Les fichiers BAM dédupliqués ainsi obtenus seront analysés à l'aide des callers Mutect2 (v4.5.0.0) et DRAGEN (v4.2) pour réaliser l'appel de variants. Pour certains gènes soumis à des duplications récurrentes (*FLT3*, *NPM1*, *UBTF*) les fichiers FASTQ seront analysés parallèlement à l'aide de l'algorithme FiLT3r (4b64c9bb), spécialement conçu pour permettre une détection efficace des duplications en tandem et des indels.¹⁰ Des essais réalisés dans le cadre du doctorat d'Augustin Boudry dans les LAM a montré l'obtention d'une limite de détection des différents callers à 1×10^{-4} .

11) Calcul de l'effectif et statistiques

Hypothèse (objectif principal)

On suppose que l'incidence des rechutes est de 20% maximum à six mois de la mesure pour les patients MRD- et qu'elle sera de 50% minimum pour les patients MRD+.

Calcul

Plusieurs analyses seront effectuées pour tester la différence d'incidence des rechutes entre les patients MRD+ et MRD- à six mois de l'évaluation (correspondant à chaque point de prélèvement). A chaque analyse, les seuils de $10e-4$ et de $10e-3$ seront testés pour l'évaluation de la positivité.

Chaque point sera testé séparément (M1, M3, M6, M9, M12).

On suppose que la MRD ne pourra pas être évaluée pour l'ensemble des patients à chaque point avec un drop-out de 5% entre chaque point (soit un drop-out d'environ 20% entre le premier et le dernier point de prélèvement)

180 patients (dont 90 resteront MRD- et 90 auront au moins un point MRD+) inclus au départ permettront de mettre en évidence pour chaque analyse une différence d'incidence de rechute de 30% à six mois de l'évaluation avec une puissance de 80% minimum et un alpha de 0,00625 (fixé pour tenir compte de la multiplicité des comparaisons).

L'étude prospective MRD-ALLO-MDS vient compléter une cohorte de patients issus des études prospectives MDS-ALLO-RISK (clinicaltrial.gov NCT02757989), DACORAL (NCT 2019-003685-40) et de l'étude non interventionnelle MDS-MRD de l'hôpital Saint-Louis à Paris et du CHU de Grenoble (CPP 2015/69NICB). Cette cohorte déjà constituée comporte 80 patients sans maintenance et 20 patients avec maintenance.

Le nombre total de patients à inclure dans MRD-ALLO-MDS prospectivement sans maintenance est donc de 100 patients.

Statistiques

Les variables continues (âge receveur et donneur, scores, paramètre biologique de la numération sanguine, MRD) seront résumées par la médiane et l'interquartile range et comparées entre les groupes par le test du t ou le test de Wilcoxon. Les variables catégorielles (caractéristique de la maladie, cytogénétique, biologie moléculaire, traitement pré greffe, statut de la maladie, conditionnement pré greffe, source du greffon) seront résumées par les fréquences et les pourcentages par catégorie et comparées entre les groupes par le test du chi2 ou le test exact de Fisher.

Des courbes d'incidences cumulées prenant en compte les risques en compétition seront construites pour étudier l'incidence des rechutes, de la mortalité sans rechute, de la GVH aiguë, de la GVH chronique et de l'injection de lymphocytes du donneur. Les risques en compétition seront : le décès sans rechute pour l'analyse des rechutes et des lymphocytes du donneur, la rechute et le décès pour

l'analyse de la GVH aiguë et de la GVH chronique. Les incidences cumulées seront estimées à différents temps et données avec des intervalles de confiance (IC) à 95 %. Les comparaisons entre les groupes seront faites par le biais du test de Gray. La survie et la survie sans maladie seront estimées par la méthode de Kaplan Meier. Les probabilités de survie et de survie sans maladie seront estimées à différents temps et données avec des intervalles de confiance (IC) à 95 %. Des courbes de survie seront construites pour la survie globale et la survie sans maladie, elles seront comparées entre les groupes en utilisant le test du log-rank. Les analyses des facteurs de risque de rechute, de survie, de survie sans maladie utiliseront le modèle de Cox (Cox cause spécifique dans le cas des risques en compétition). Les facteurs de risque de rechute sont les suivants : l'âge patient et receveur, le sexe patient et donneur, la classification de la maladie, le paramètre de la numération avant la greffe, la cytogénétique à la greffe, la biologie moléculaire au diagnostic et à la greffe, le traitement avant la greffe et le statut de la maladie avant la greffe.

Les analyses d'incidence ou de survie seront réalisées à partir de la date de greffe ou de la date de mesure de la MRD selon les cas.

Plusieurs analyses seront effectuées pour tester la différence d'incidence des rechutes, de la survie, de la survie sans progression entre les patients MRD+ et MRD- au seuil de 10^{-4} à chaque point de prélèvement (M1, M3, M6, M9, M12). Ces analyses seront répétées en utilisant un seuil de 10^{-3} .

Deux analyses en sous-groupes seront réalisées pour l'analyse des rechutes :

- les patients pour lesquels un traitement de maintenance est planifié
- les patients pour lesquels un traitement de maintenance n'est pas prévu

afin d'étudier plus précisément si le changement de statut MRD- / MRD+ est différent selon que les patients reçoivent ou non un traitement de maintenance et si l'impact de la MRD+ sur l'incidence des rechutes diffère selon ces groupes.

Plusieurs analyses en landmark seront effectuées à partir de la greffe pour analyser l'impact de la GVHD (chronique ou aiguë) sur la MRD et sur la rechute et pour étudier l'impact des lymphocytes du donneur sur la rechute.

Des diagrammes de flux - plus particulièrement des diagrammes alluvial – seront utilisés pour représenter l'évolution de la MRD dans le temps. Ces graphiques seront représentés pour l'ensemble des patients et selon qu'ils aient ou non une maintenance planifiée.

Les analyses seront réalisées avec R version 4.3.3.

11) Calendrier de suivi des patients

Durée d'inclusion : 18 mois

Durée de suivi des patients : 18 mois

Durée totale de l'étude : 36 mois

12) Références

- 1 Duployez N, Preudhomme C. Monitoring molecular changes in the management of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2024; published online June 27. DOI:10.1111/bjh.19614.
- 2 Fu Y, Schroeder T, Zabelina T, *et al*. Postallogeic monitoring with molecular markers detected by pretransplant next-generation or Sanger sequencing predicts clinical relapse in patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol* 2014; **92**: 189–94.

- 3 Duncavage EJ, Jacoby MA, Chang GS, *et al.* Mutation Clearance after Transplantation for Myelodysplastic Syndrome. *N Engl J Med* 2018; **379**: 1028–41.
- 4 Tobiasson M, Pandzic T, Illman J, *et al.* Patient-Specific Measurable Residual Disease Markers Predict Outcome in Patients With Myelodysplastic Syndrome and Related Diseases After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *JCO* 2024; **42**: 1378–90.
- 5 Robin M, Nibourel O, Tournaire M, *et al.* Molecular alterations monitoring in myelodysplastic patients receiving an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after a reduced-intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant* 2024; **59**: 1309–12.
- 6 Schroeder T, Rachlis E, Bug G, *et al.* Treatment of Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation with Azacitidine and Donor Lymphocyte Infusions—A Retrospective Multicenter Analysis from the German Cooperative Transplant Study Group. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2015; **21**: 653–60.
- 7 Mo X-D, Qin Y-Z, Zhang X-H, *et al.* Minimal residual disease monitoring and preemptive immunotherapy in myelodysplastic syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2016; **95**: 1233–40.
- 8 Platzbecker U, Middeke JM, Sockel K, *et al.* Measurable residual disease-guided treatment with azacitidine to prevent haematological relapse in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia (RELAZA2): an open-label, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2018; **19**: 1668–79.
- 9 Nannya Y, Tobiasson M, Sato S, *et al.* Postazacitidine clone size predicts long-term outcome of patients with myelodysplastic syndromes and related myeloid neoplasms. *Blood Advances* 2023; **7**: 3624–36.
- 10 Boudry A, Darmon S, Duployez N, *et al.* Frugal alignment-free identification of FLT3-internal tandem duplications with FiLT3r. *BMC Bioinformatics* 2022; **23**: 448.

FICHE D'INCLUSION MRD-ALLO-MDS

Merci de transmettre une copie de cette fiche d'inclusion au GFM par mail :

marie.robin@aphp.fr / fatiha.cheramat-ext@aphp.fr

DONNEES DU CENTRE

NUMERO DU CENTRE DE GREFFE: |_|_|

DATE D'INCLUSION : |_|_| |_|_| |_|_|_|_|

NUMERO D'INCLUSION* : |_|_|-|_|_|_|-|_|-|_|

**N° du centre - N° du patient - Première lettre du nom du patient - Première lettre du prénom du patient*

DONNEES PATIENTS

NOM (première lettre): |_|

PRENOM (première lettre): |_|

ANNEE DE NAISSANCE : |_|_|_|_|

Sexe : ☐ Homme ☐ Femme

MALADIE (un critère requis)

☐ Syndrome myélodysplasique (SMD)

☐ Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)

☐ Leucémie aiguë myéloblastique (LAM post SMD ou LMMC)

DATE DE GREFFE PREVUE : |_|_| |_|_| |_|_|_|_|

MAINTENANCE PREVUE : ☐ vidaza ☐ vidaza ven ☐ DLI ☐ autre : précisez-----

NUMERO DU REGISTRE SFGM-TC / EBMT (si connu) :

CRITERES D'INCLUSION

Patient âgé de 18 ans ou plus ☐

Patient greffé pour SMD ou LMMC ☐

Tout type de greffe, de donneur et de conditionnement ☐

CRITERE D'EXCLUSION

Patient refusant l'étude ☐

Patient refusant l'enregistrement de ses données cliniques dans le registre EBMT ☐

Liste d’identification des patients

ÉTUDE MRD-ALLO-MDS

**Evaluation de la maladie résiduelle des patients allogreffés de cellules souches
hématopoïétiques pour un syndrome myélodysplasique**

Nom de l’investigateur :

Centre :

Numéro de centre : |_|_|

Nom Patient	Prénom Patient	Date de naissance	Numéro d’inclusion	Numéro du registre SFGM-TC / EBMT