



Recherche de la MRD dans le suivi du myélome multiple : applications au laboratoire

Florian BÉLIK

Pharmacien Biologiste

CHU UCL Namur site Sainte-Elisabeth

LJBM Les Jeudis de la Biologie Médicale

Anciennement Les Jeudis de Fleurus

Le jeudi 16 octobre 2025

SANTÉ
MONTIGNIES-SUR-
SAMBRE

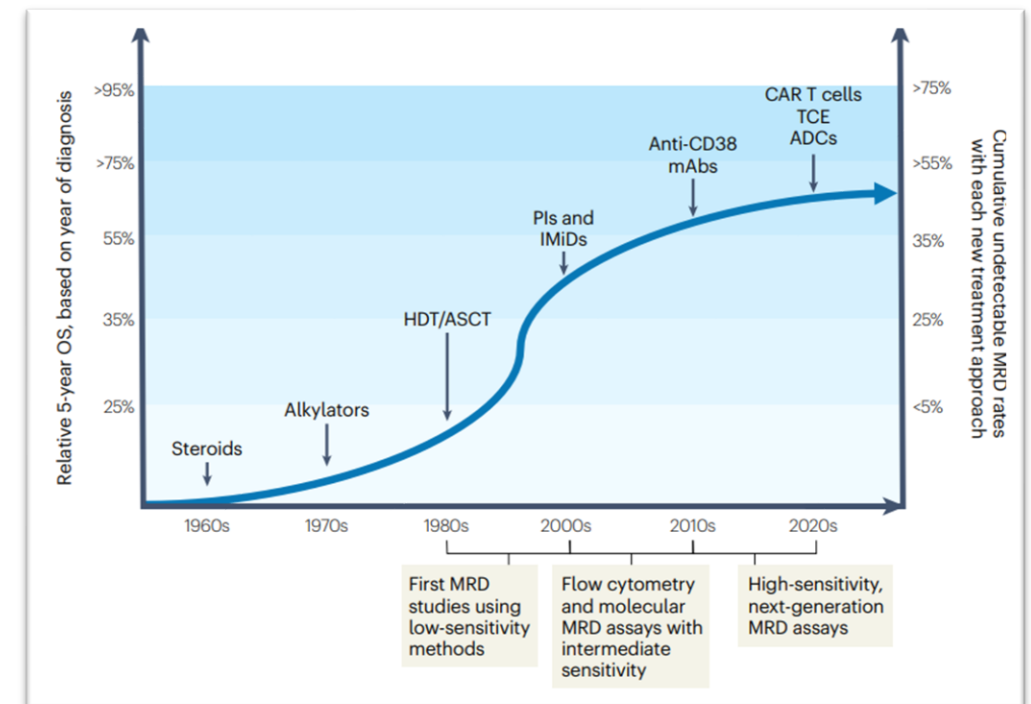
Plan

- Introduction
 - Myélome multiple et traitements
 - Catégories de réponse de l'IMWG
 - MRD
- Recherche de la MRD par cytométrie en flux
 - Panel EuroFlow®
 - Combinaison 1 tube 10 couleurs
 - Interprétation des résultats
- Recherche de la MRD par analyses moléculaires
 - ASO-qPCR
 - NGS
- Comparaison des techniques de recherche de MRD
- Imagerie
- Perspectives : peripheral residual disease (PRD)
 - Protéine monoclonale par spectrométrie de masse
- Retour d'expérience : THE MMOVE PROJECT
- Conclusions

Introduction

Myélome multiple et traitements

- Prévalence : 1-2% des cancers et 10-15% des hémopathies malignes
- Survie médiane : 6 mois sans traitement efficace chez les patients symptomatiques
- Amélioration significative des taux de survie au cours des 20 dernières années
- Traitements actuels :
 - Inhibiteurs du protéasome
 - Bortézomib (VELCADE), Carfilzomib (KYPROLIS), Ixazomib (NINLARO)
 - Immunomodulateurs
 - Thalidomide, Lenalidomide (REVLIMID), Pomalidomide (IMNOVID)
 - Anticorps monoclonaux
 - Anti-CD38 : Daratumumab (DARZALEX), Isatuximab (SARCLISA),
 - Greffe de cellules souches autologues
 - (Chimiothérapies classiques et corticostéroïdes)



Catégories de réponses de l'IMWG (*International Myeloma Working Group*)

Réponse Partielle (*PR – partial response*)

- Réduction ≥ 50 % de l'immunoglobuline monoclonale sérique
- Réduction ≥ 90 % ou < 200 mg/24h de l'immunoglobuline monoclonale urinaire
- Réduction ≥ 50 % de la taille des plasmocytomes des tissus mous (si présents au départ)

Très bonne réponse partielle (*VGPR - very good partial response*)

- Respect des critères de PR
- Immunoglobuline monoclonale (sérique/urinaire) détectable uniquement par immunofixation, mais absente sur électrophorèse

OU

- Réduction ≥ 90 % de l'immunoglobuline monoclonale sérique et immunoglobuline monoclonale urinaire < 100 mg/24h

Catégories de réponses de l'IMWG (*International Myeloma Working Group*)

Réponse complète (*CR – complete response*)

- Absence de protéine monoclonale à l'immunofixation sérique et urinaire
- <5 % de plasmocytes clonaux à la ponction médullaire
- Disparition des plasmocytomes des tissus mous (si présents au départ)

Réponse complète stricte (*sCR – stringent complete response*)

- Respect des critères de CR
- Ratio normal des chaînes légères libres
- Absence de cellules clonales détectées par immunohistochimie : Ratio $\kappa/\lambda \leq 4:1$ ou $\geq 1:2$ après analyse d'au moins 100 plasmocytes dans la biopsie médullaire

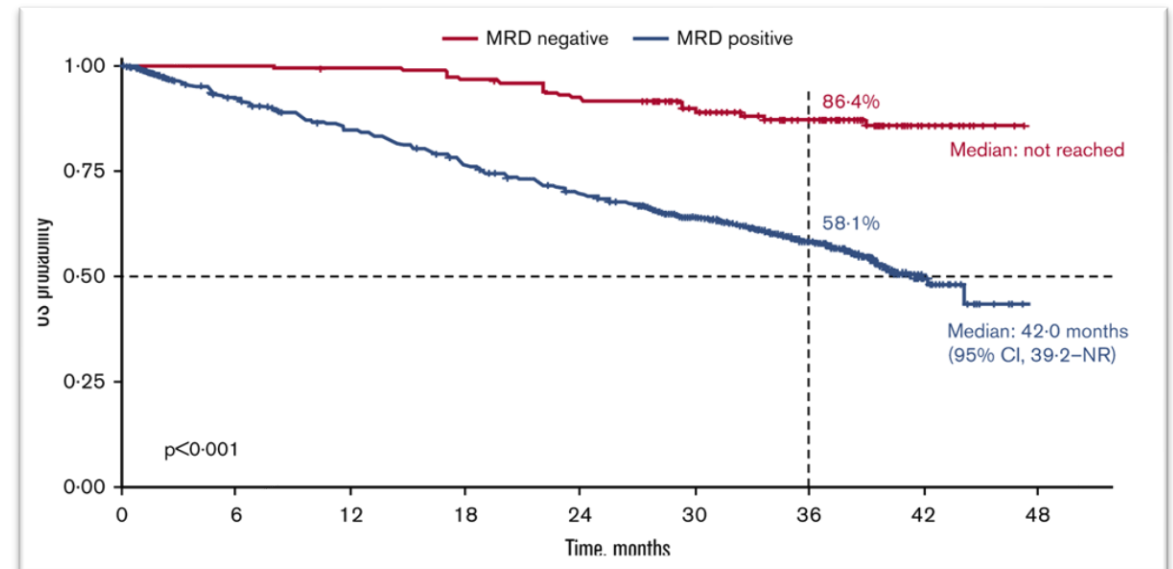
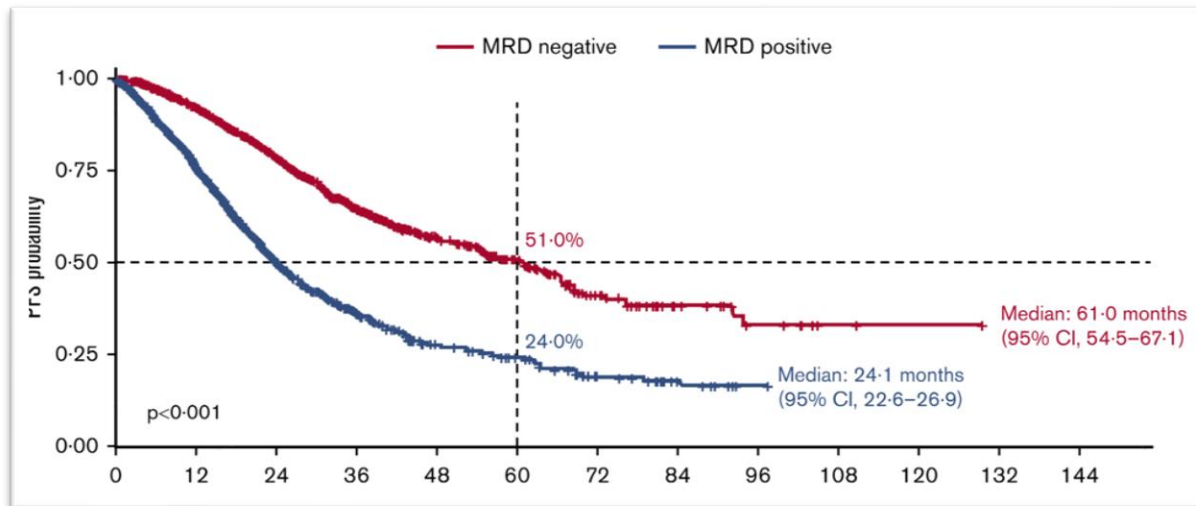
Maladie résiduelle minimale (MRD – *Minimal residual disease*)

- Nouveaux traitements en combinaison avec greffes de cellules souches autologues : >50% de réponses complètes
- Malgré réponses complètes : rechutes
 - Il y a quelque chose qui persiste mais qui n'est pas détecté
- Nécessité d'aller plus loin : recherche et quantification de la MRD
 - Apparition dans les critères de l'IMWG 2016
 - NGF et NGS
 - Les études montrent que la MRD :
 - Est un facteur pronostique : amélioration de *Progression-free survival* (PFS) et de *Overall survival* (OS)
 - A un impact thérapeutique : en cours d'évaluation dans plusieurs études clinique

MRD comme facteur pronostique

Méta-analyse en 2020 dans *Blood Adv.*

- Evaluation de *Progression-free survival* (PFS) et de *Overall survival* (OS)
 - 44 études et 8098 patients inclus (PFS)
 - 23 études et 4297 patients inclus (OS)



MRD et impact thérapeutique

- Plusieurs études cliniques en cours évaluent une adaptation de traitement en fonction du statut MRD :
 - Intensification du traitement si MRD+
 - Arrêt du traitement de maintenance si MRD- et soutenue
 - Changement de traitement si conversion MRD- vers MRD+
 - Etude MASTER (2022)
 - Induction par Dara-KRd, greffe autologue, consolidation Dara-KRd
 - Après 2 MRD négatives : *treatment-free MRD surveillance*
 - Permet d'éviter des cycles supplémentaires non nécessaires
- La MRD est un *endpoint* des essais cliniques actuels

Catégories de réponses de l'IMWG

IMWG MRD criteria (requires a complete response as defined below)

Sustained MRD-negative	MRD negativity in the marrow (NGF or NGS, or both) and by imaging as defined below, confirmed minimum of 1 year apart. Subsequent evaluations can be used to further specify the duration of negativity (eg, MRD-negative at 5 years) [†]
Flow MRD-negative	Absence of phenotypically aberrant clonal plasma cells by NGF [‡] on bone marrow aspirates using the EuroFlow standard operation procedure for MRD detection in multiple myeloma (or validated equivalent method) with a minimum sensitivity of 1 in 10 ⁵ nucleated cells or higher
Sequencing MRD-negative	Absence of clonal plasma cells by NGS on bone marrow aspirate in which presence of a clone is defined as less than two identical sequencing reads obtained after DNA sequencing of bone marrow aspirates using the LymphoSIGHT platform (or validated equivalent method) with a minimum sensitivity of 1 in 10 ⁵ nucleated cells [§] or higher
Imaging plus MRD-negative	MRD negativity as defined by NGF or NGS plus disappearance of every area of increased tracer uptake found at baseline or a preceding PET/CT or decrease to less mediastinal blood pool SUV or decrease to less than that of surrounding normal tissue [¶]

Cytométrie en flux

Séquençage

1 cellule tumorale sur 100.000 WBC

Quantification: Plasmocytes clonaux/ WBC

Recherche de la MRD par cytométrie en flux

MRD par cytométrie en flux

- Repose sur la recherche des cellules plasmocytaires clonales (phénotype pathologique)
- Connu et utilisé depuis de nombreuses années
 - Le gold standard actuel (avec le NGS)
 - On connaît les marqueurs d'intérêt
 - Au départ : 4-6 couleurs (sensibilité < NGS)
 - Ensuite : 8-10 couleurs et protocole bulk-lyse : 1.10^5 (sensibilité = NGS) → NGF

cells to estimate minimal residual disease, and a sensitivity of one in 10^5 cells or higher is needed to fulfil the criteria for the next-generation flow method.

- Cela reste assez hétérogène
 - Marqueurs utilisés, techniques de traitement échantillon, protocoles
- Nécessité d'une standardisation
 - Panel EuroFlow® (Cytognos)

Panel EuroFlow® (Cytognos)

- *EuroFlow next-generation flow method for minimal residual disease detection in multiple myeloma*
- Conçu par le consortium EuroFlow pour la recherche de MRD dans le myélome multiple
- Standardisation totale
 - Pré-analytique
 - Etape préliminaire de bulk-lysis : permet d'atteindre 5 millions de cellules
 - Analytique
 - Combinaison de deux tubes 8 couleurs
 - Post-analytique
 - Logiciel d'interprétation automatisé

EUROFLOW™ MULTIPLE MYELOMA MRD PANEL						PATENTED!	
BV421*	BV510*	FITC	PE	PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750
CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CylgKappa	CylgLambda

*Not included in the MM MRD kit. Should be added as drop-ins.

Panel EuroFlow® (Cytognos)

- Avantages :

- Panel validé sur un large nombre de patients en études multicentriques
- Utilisation standardisée dans de nombreuses études cliniques
- Logiciel d'aide à l'interprétation « *Automated Gating and Identification* » pour l'identification des cellules plasmocytaires clonales résiduelles (et des autres populations cellulaires)
 - Analyse conjointe d'indicateur qualité de l'échantillon (mastocytes, hématogones,...)
- Les anticorps existent en mélange lyophilisé
 - Permet d'éviter les erreurs de pipetages
- 8 couleurs : accessible pour un plus grand nombre de laboratoires

- Inconvénients :

- Coût élevé
 - 3200€ / 20 tests
- Combinaison en deux tubes
 - Redondance des marqueurs
 - Perte d'information liée à l'analyse combinée (ex: CD117 et chaînes légères)
 - Analyse longue
 - Volume échantillon nécessaire plus important

EUROFLOW™ MULTIPLE MYELOMA MRD PANEL							PATENTED!	
BV421*	BV510*	FITC	PE	PerCP-Cyanine5.5	PE-Cyanine7	APC	APC-C750	
CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	
CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CyIgKappa	CyIgLambda	

*Not included in the MM MRD kit. Should be added as drop-ins.

Combinaison 1 tube 10 couleurs

- Buts :
 - Mise en place d'une méthode de recherche de MRD moins coûteuse en temps et en argent
 - Tout en gardant une sensibilité optimale (1.10^5)
 - Rédaction d'un dossier de validation en vue d'une accréditation ISO 15189
- Littérature

> Am J Clin Pathol. 2016 Jul;146(1):41-9. doi: 10.1093/ajcp/aqw052.

Single-Tube 10-Fluorochrome Analysis for Efficient Flow Cytometric Evaluation of Minimal Residual Disease in Plasma Cell Myeloma

Daniel J Royston ¹, Qi Gao ², Nghia Nguyen ², Peter Maslak ², Ahmet Dogan ², Mikhail Roshal ³

Affiliations + expand

PMID: 27402608 PMCID: PMC6365913 DOI: 10.1093/ajcp/aqw052

To improve efficiency and to reduce costs, alternate single-tube ten-colour and 14-colour methods have been suggested by some centres. The single-tube approach will undergo detailed cross-validation with reference to the next-generation flow method to allow for standardisation.

IMWG 2016

Combinaison 1 tube 10 couleurs

- Avantages :
 - Gain de temps
 - Traitement des échantillons
 - Acquisition sur les cytomètres
 - Optimisation du matériel récolté lors de la ponction médullaire
 - Parfois trop peu de matériel reçu pour diviser en deux tubes
 - Analyse des Kappa/Lambda sur toutes les sous-populations
 - Coûts plus faibles
 - ~25€ / test
 - Utilisation du même panel pour autres situations cliniques
 - Diagnostic de myélome multiple, MGUS

Combinaison 1 tube 10 couleurs

- 10 marqueurs sur un tube unique :
 - **CD38** BV510 (BD)
 - **CD138** APC (BC IT)
 - **CD45** APC-H7 (BD)
 - **CD19** PC7 (BC IT)
 - **CD27** BV605 (Biolegend)
 - **CD56** APC-R700 (BD)
 - **CD81** PB (BC IT)
 - **CD117** PC5.5 (BC IT)
 - **Igκ cytoplasmique** FITC (Multimix Dako)
 - **Igλ cytoplasmique** PE (Multimix Dako)
- Mêmes cibles que le panel EuroFlow

Combinaison 1 tube 10 couleurs

- Mode opératoire

- Filtration de l'échantillon médullaire avec une seringue 21G + filtre 50µm
- Prélever 100µL d'échantillon
- Ajout des marqueurs de surface (CD19, CD27, CD38, CD45, CD56, CD81, CD117, CD138)
- Vortex + incubation 20min à T° ambiante et à l'abri de la lumière
- Ajout 3mL PBS + centrifugation 5min à 600g
- Enlever le surnageant
- Vortex le tube
- Ajout réactif 1 du kit Perfix-nc (fixateur)
- Vortex + incubation 15min à T° ambiante et à l'abri de la lumière
- Ajout réactif 2 du kit Perfix-nc (perméabilisant) + Multimix κ/λ (marqueurs intracytoplasmiques)
- Ajout réactif 3 dilué du kit Perfix-nc (tampon) et centrifugation 5min à 600g
- Enlever le surnageant
- Vortex le tube
- Ajout réactif 3 dilué du kit Perfix-nc (tampon)



Combinaison 1 tube 10 couleurs

- Pré-analytique
 - Utilisation du 1^{er} tube de ponction
 - Eviter l'hémodilution
 - Gain de sensibilité
 - Manipulation et analyse le jour de la ponction
 - Stabilité des plasmocytes
 - Traitement des échantillons
 - ~ 1h30
 - Acquisition
 - FACS Lyrics (BD)
 - Doit se faire dans l'heure qui suit le marquage
 - ~ 10 minutes

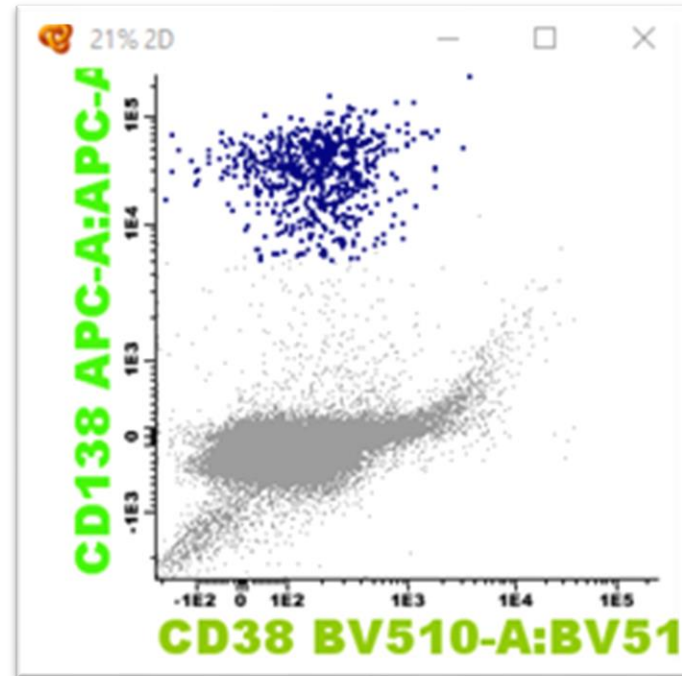
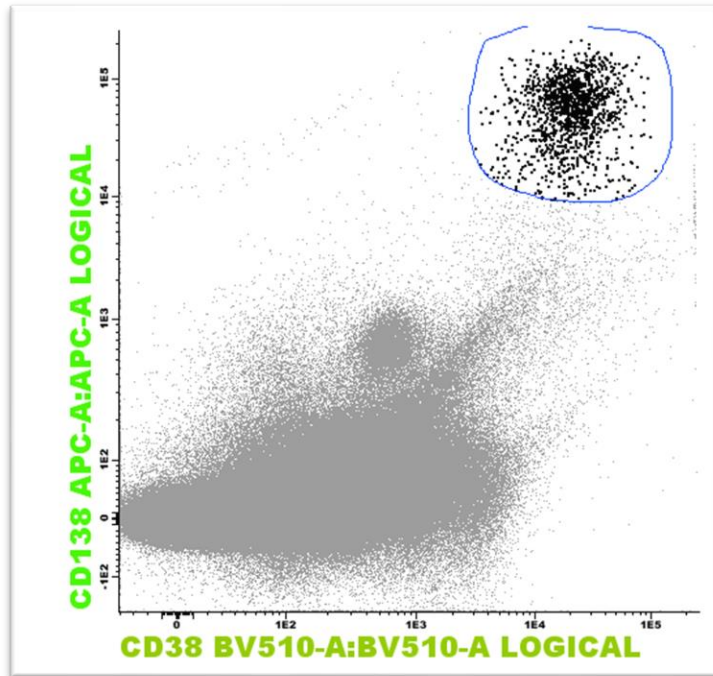
5.1.7 Prélèvement de moelle / Ponction médullaire

Selon les analyses à réaliser, voici les prélèvements nécessaires :

- Médullogramme + Cytométrie en flux : 1 petit EDTA (min 1mL) → **à remplir lors de la 1ère aspiration**

Interprétation des résultats

- Logiciel Infinicyt® en mode manuel (Cytognos, BD)
- Sélection de la population plasmocytaire totale (CD38+/CD138+)
 - Vigilance si traitement par anti-CD38 (Daratumumab, Isatuximab)
 - Diminution de la disponibilité de l'épitope CD38 pour l'anti-CD38 couplé au fluorochrome
 - Mécanisme d'échappement aux anti-CD38 suite au traitement



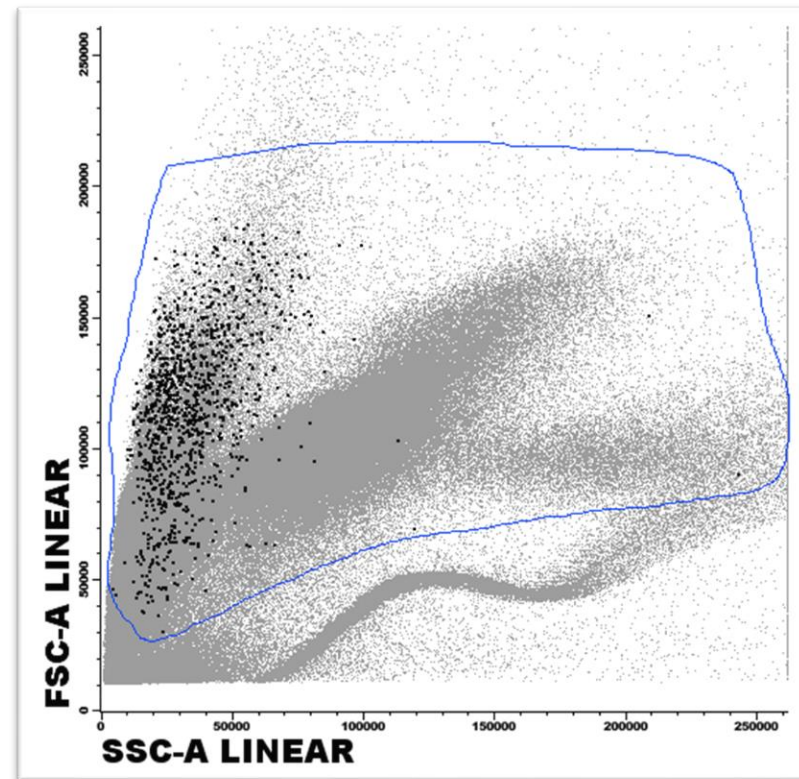
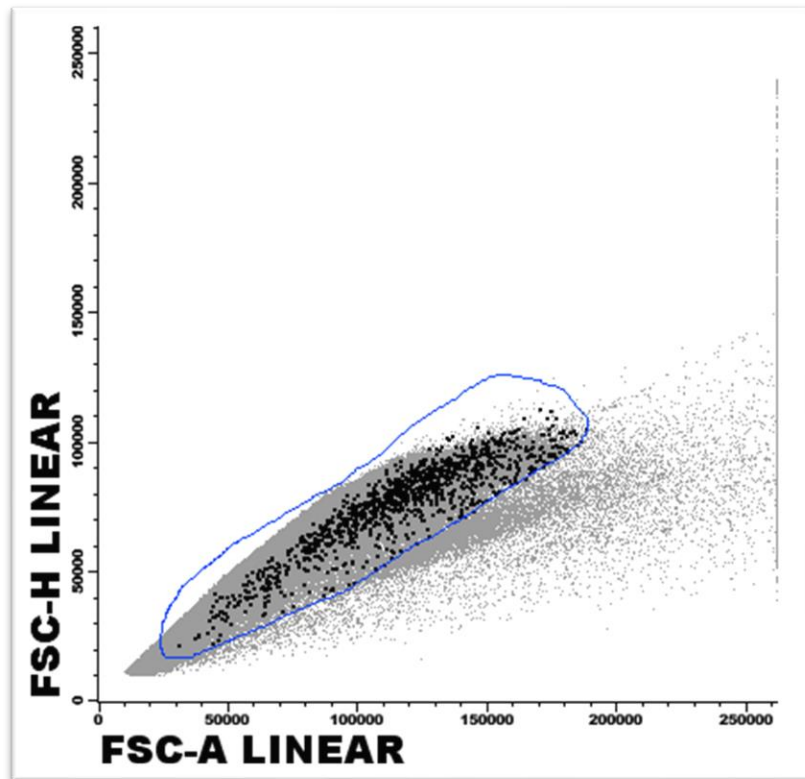
Solutions :

- Stratégie de *gating*
- CD38 multi-épitope
- Cibles alternatives : IRF-4, CD38 intra-cytoplasmique
 - Performance non supérieure au CD38 multi-épitope

Remarque: ne pas commencer par un fenêtrage des globules blancs (CD45+) car les plasmocytes anormaux ont souvent une expression diminuée ou négative du CD45

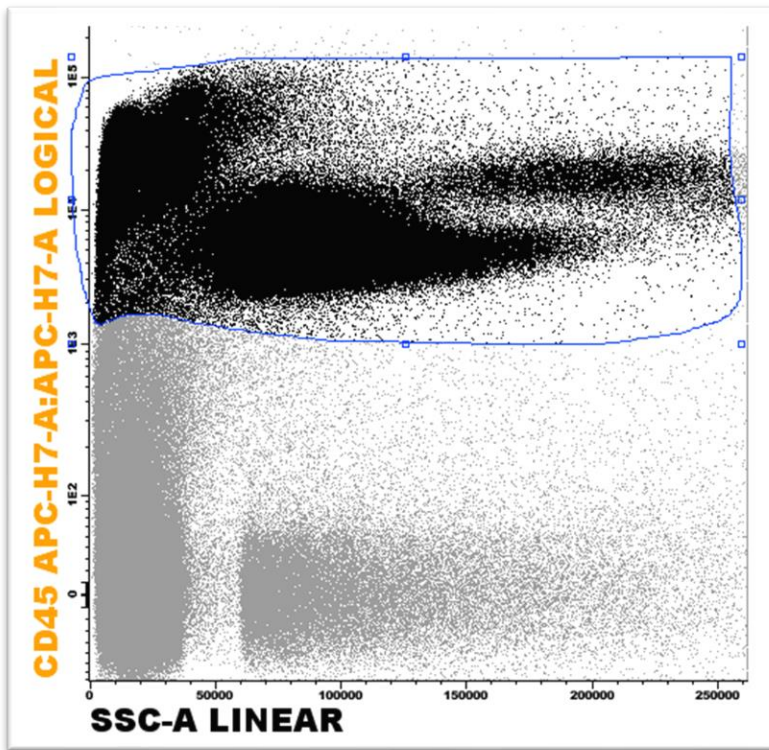
Interprétation des résultats

- Exclusion des doublets (FSC-H/ FSC-A)
- Exclusion débris et éventuels chylomicrons (FSC/ SSC)

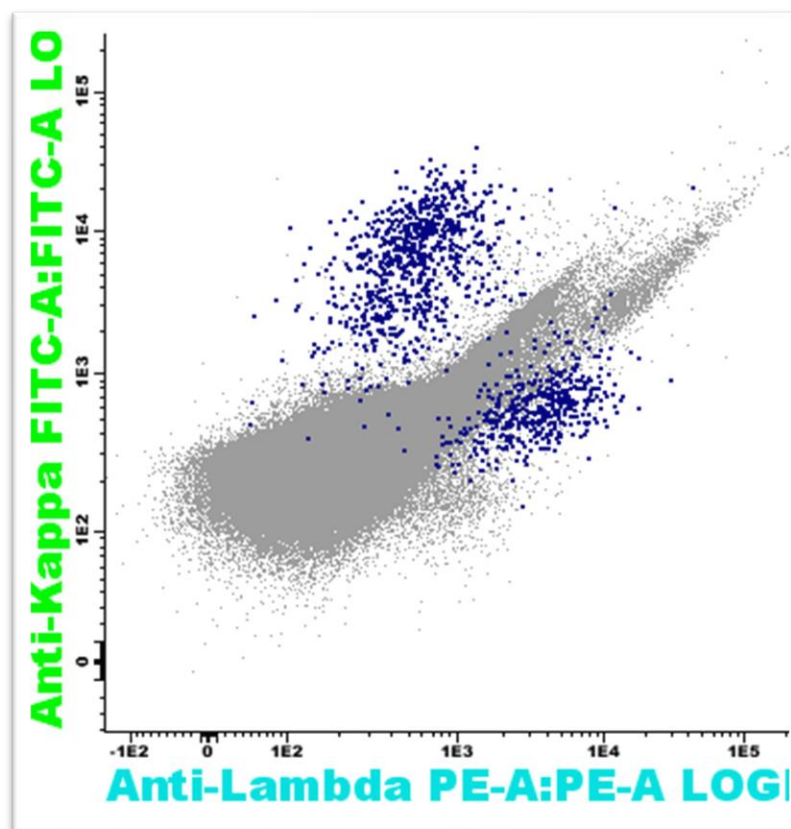
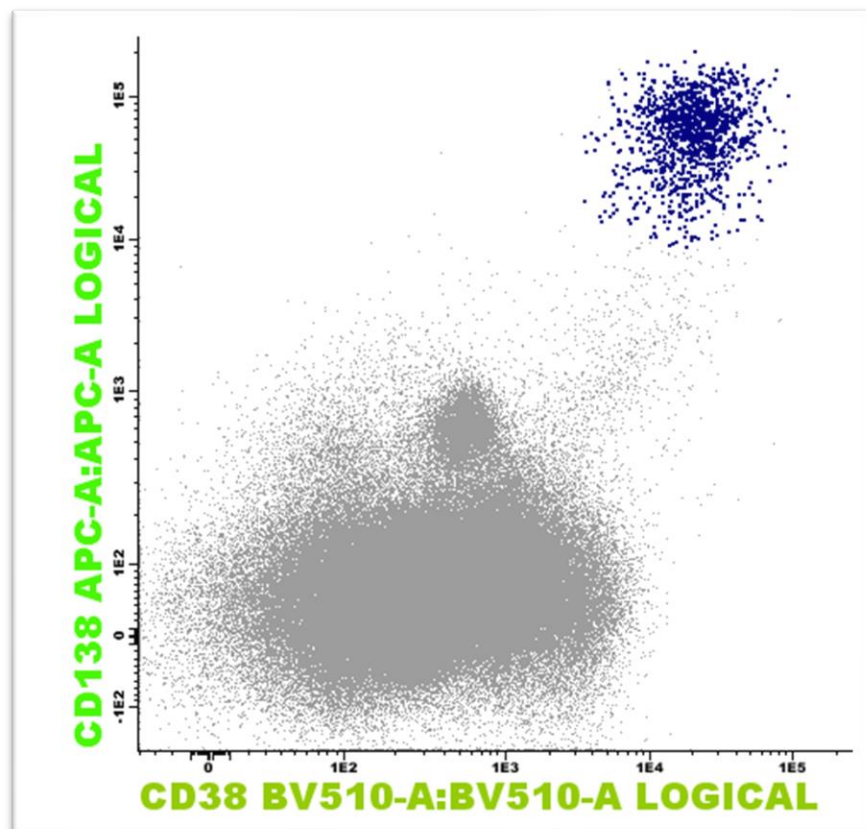


Interprétation des résultats

- Sélection de la totalité des globules blancs (CD45/ SSC)
- Exclusion des doublets (FSC-H/ FSC-A)
- Exclusion débris et éventuels chylomicrons (FSC/ SSC)



Interprétation des résultats



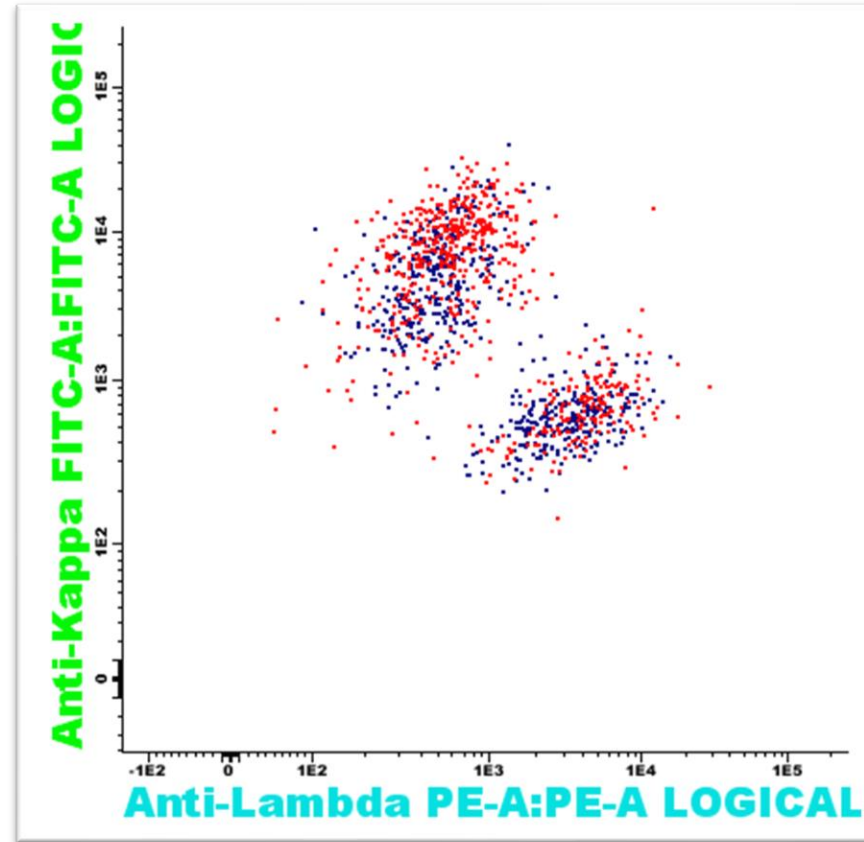
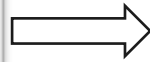
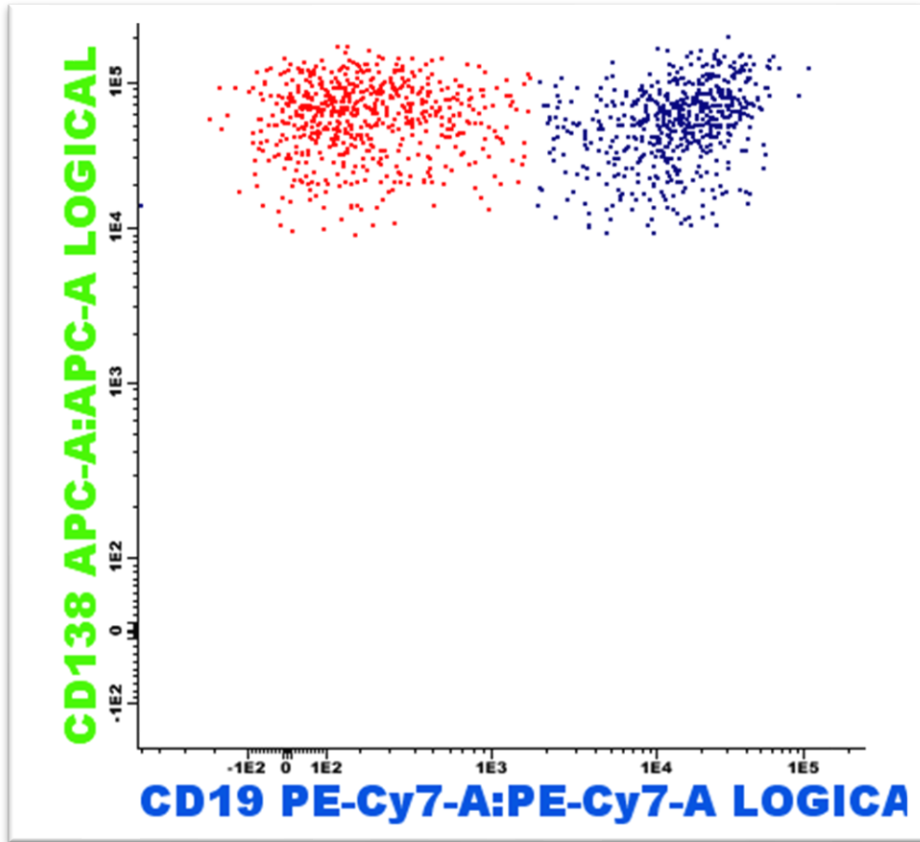
Plasmocytes : 0,34%
des cellules nucléées.

Kappa : 64%
Lambda : 36%

Interprétation des résultats

- Recherche de sous-populations plasmocytaires anormales parmi la population plasmocytaire totale
- Utilisation du phénotype de départ si disponible
 - Vigilance si switch phénotypique
- Marqueurs d'intérêt
 - CD19, CD27, CD45, CD81
 - CD56, CD117
- Confirmation de la clonalité avec expression des chaînes légères κ/λ

Interprétation des résultats

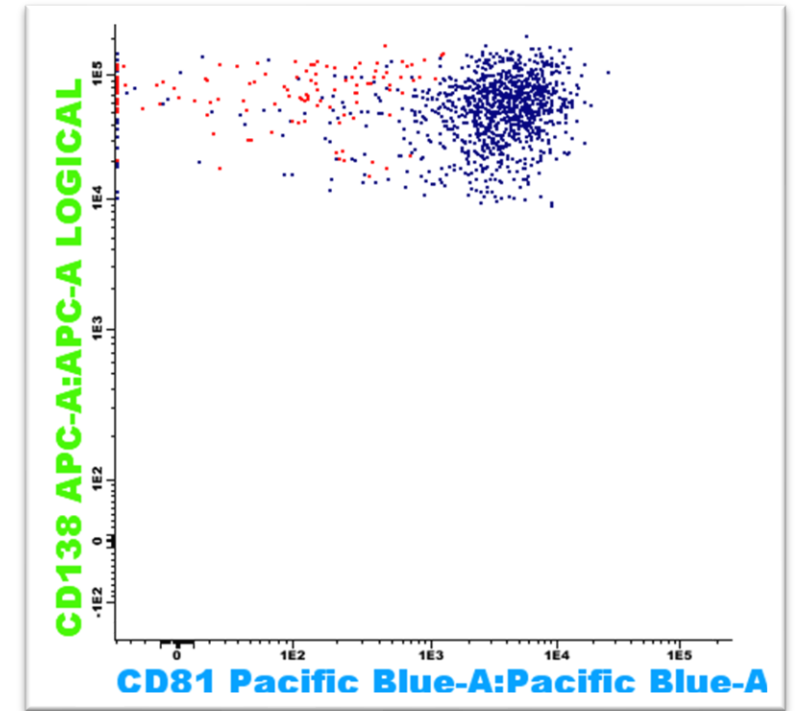
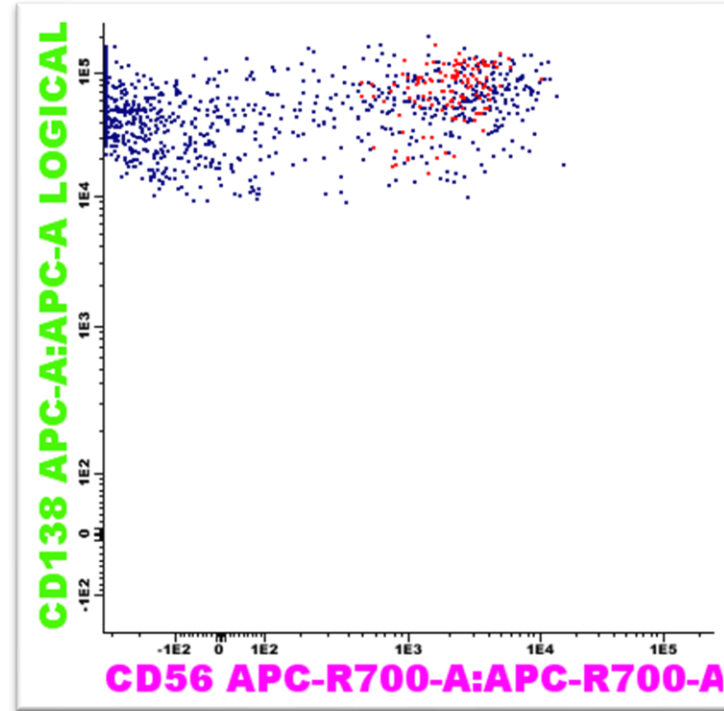
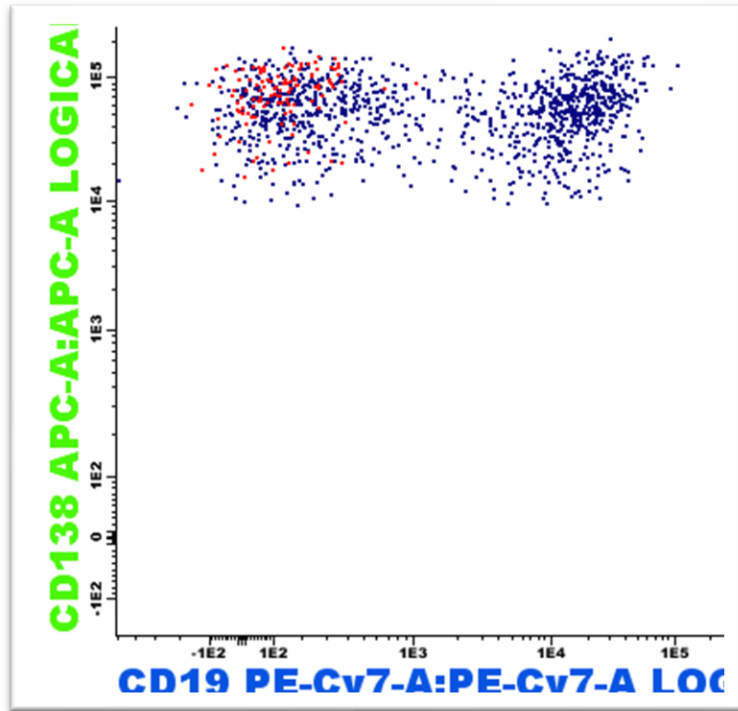


Pas de
monotypie
franche
détectée

Kappa : 70%
Lambda : 30%

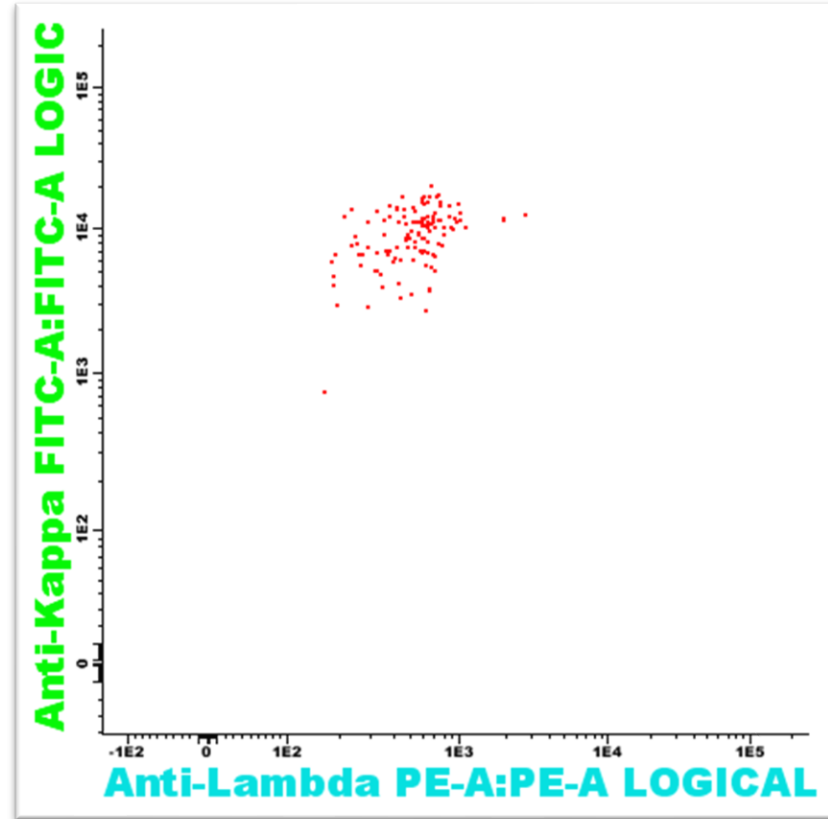
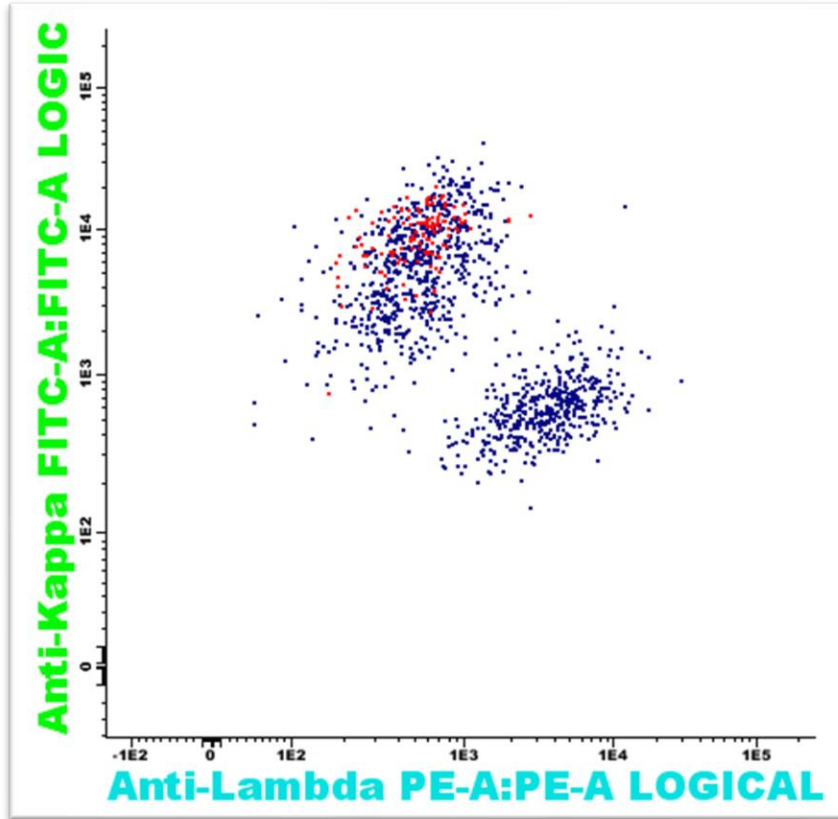
Remarque : on peut observer jusqu'à environ 30 % de plasmocytes normaux n'exprimant pas le CD19 au sein d'un échantillon

Interprétation des résultats



Combinaison de plusieurs marqueurs aberrants
Exemple : CD19- et CD56+ et CD81-

Interprétation des résultats

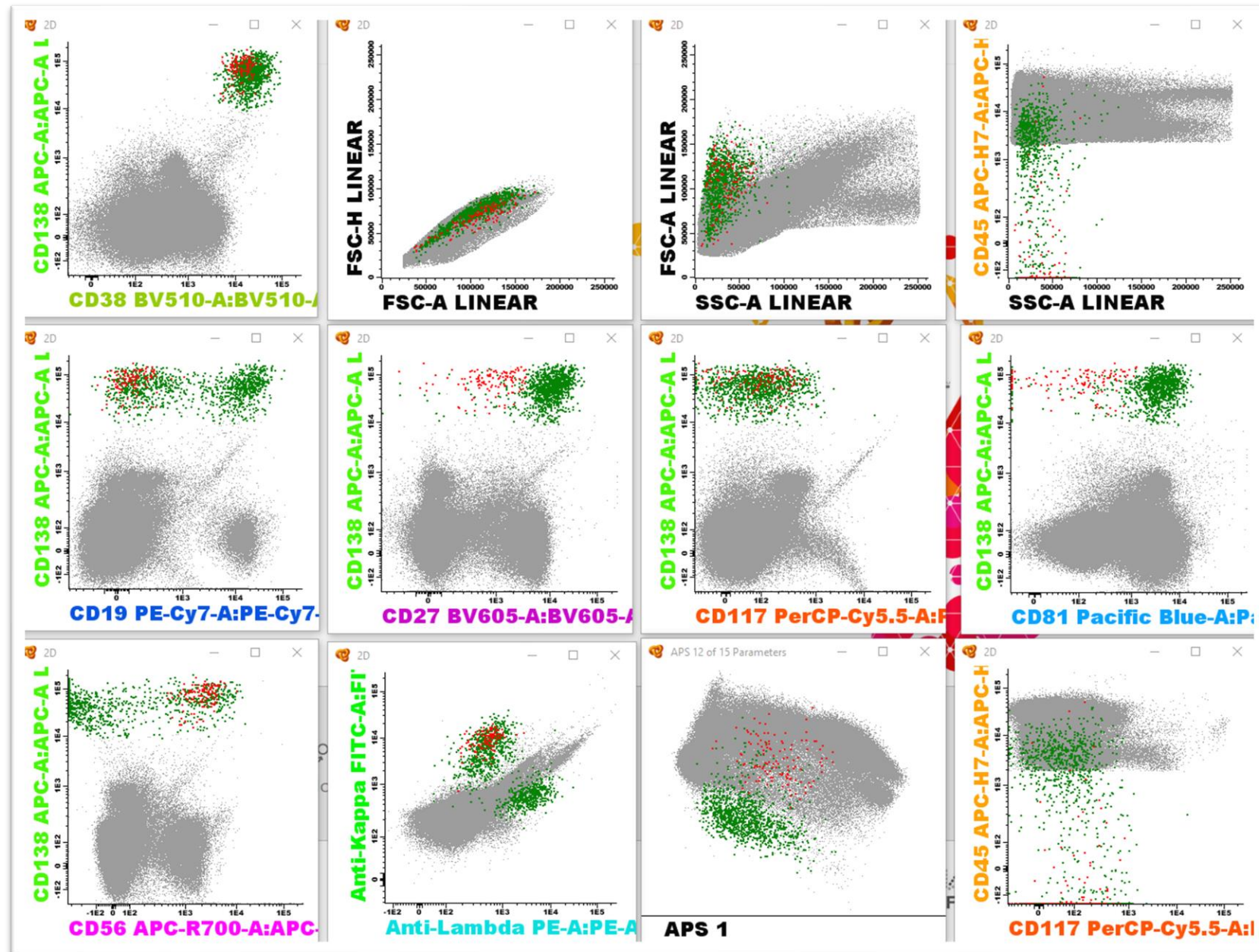


Monotypie décelée

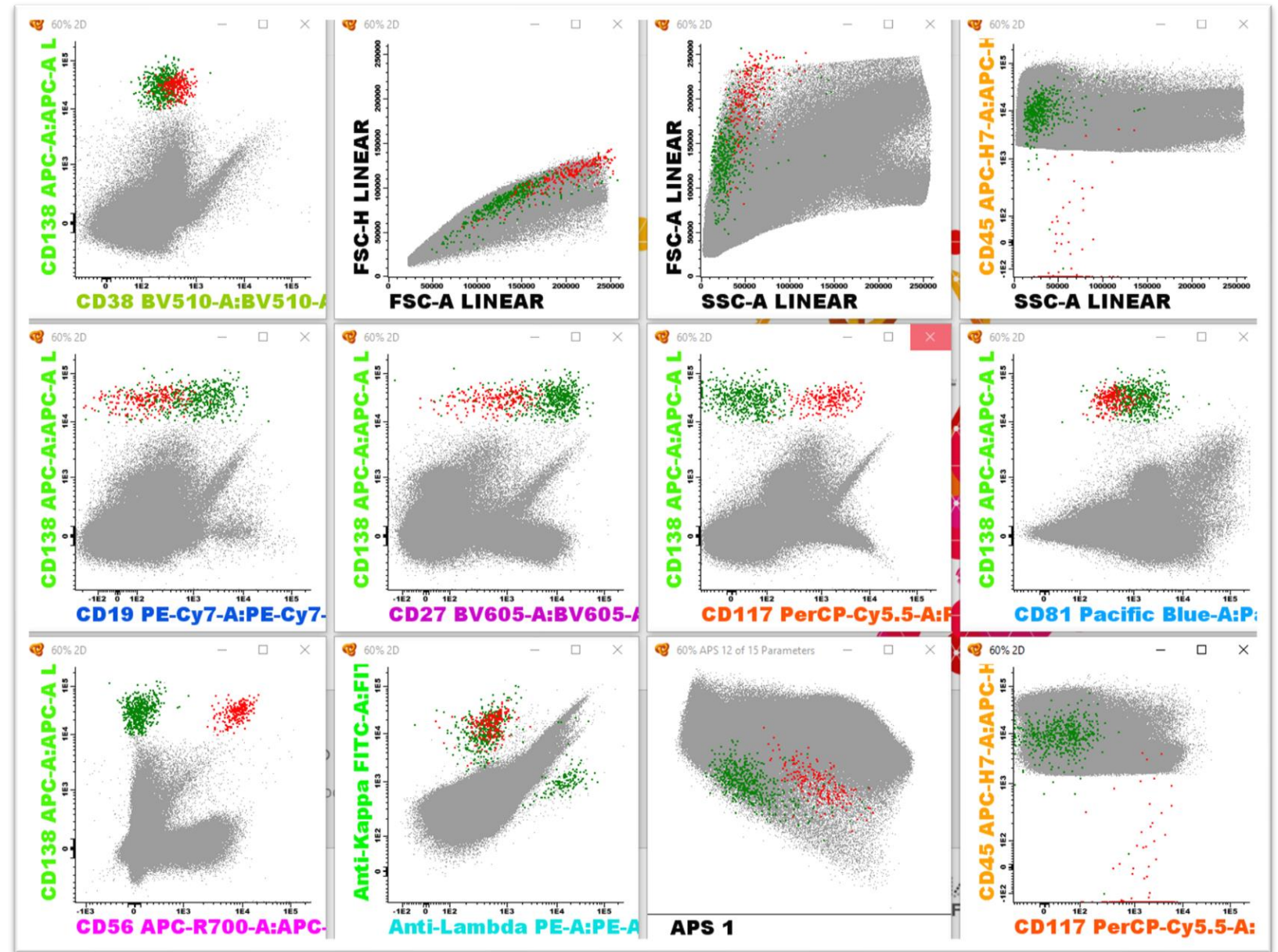
Kappa : 100%

Phénotype initial au diagnostic

Plasmocytes anormaux
représente 9% des
plasmocytes totaux et
0,033% des cellules
nuclées



- 3.460.960 évènements
- 1.781.874 globules blancs
- 1281 plasmocytes (0,07%)
- 913 plasmocytes normaux (0,05%)
- 368 plasmocytes anormaux (0,02%)



Interprétation des résultats

- Conclusion générale du protocole CMF doit comprendre :
 - La méthode utilisée
 - Cytométrie en flux 10 couleurs
 - La détection (ou non) de plasmocytes anormaux
 - Une description du profil immunophénotypique
 - Quantification
 - Plasmocytes anormaux / globules blancs totaux (MRD)
 - Plasmocytes anormaux / plasmocytes totaux
 - Mentionner la limite de détection : 0,001% selon les critères IMWG

Consensus Guidelines on Plasma Cell Myeloma Minimal Residual Disease Analysis and Reporting

**Maria Arroz,^{1*} Neil Came,² Pei Lin,³ Weina Chen,⁴ Constance Yuan,⁵ Anand Lagoo,⁶
Mariela Monreal,⁷ Ruth de Tute,⁸ Jo-Anne Vergilio,⁹ Andy C. Rawstron,¹⁰
and Bruno Paiva¹¹**

Dossier validation (ISO 15189)

- COFRAC : *"Validation/ Vérification sur site des performances d'une méthode et méthodes de calcul des critères de performances "*
 - Complexe de valider une méthode de CMF étant donné l'absence de matériel de référence, ou de cellules avec une variation dans le niveau d'expression des antigènes analysés
- Article de Wood B et al. (2013)
 - Répétabilité
 - Reproductibilité
 - Justesse
 - Exactitude
 - LOD, LOQ
 - Linéarité
 - Interchangeabilité des automates
 - Interférences
 - Contamination inter-échantillons
 - Stabilité des plasmocytes



Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS – Part V – Assay Performance Criteria

Brent Wood,¹ Dragan Jevremovic,² Marie C. Béné,³ Ming Yan,⁴ Patrick Jacobs,⁵
Virginia Litwin^{6*}; on behalf of ICSH/ICCS Working Group¹

¹University of Washington, Seattle, Washington, USA

²Mayo Clinic, Division of Hematopathology, Rochester, Minnesota, USA

³Immunology, Laboratory, CHU, de Nancy & Lorraine Université, Vandoeuvre les Nancy, France

⁴Immunocytometry Systems, BD Biosciences, San Jose, California, USA

⁵Life Technologies, Director of Flow Cytometry Sales, North America

⁶Hematology, Covance Central Laboratory Services, Inc., Indianapolis, Indiana, USA

UK NEQAS

Leucocyte Immunophenotyping

Sheffield Teaching Hospitals NHS
NHS Foundation Trust

Measurable Residual Disease for Plasma Cell Myeloma by Flow Cytometry (Not Accredited) Programme

All Participant Report

Distribution - 232401

Sample - 025

Participant ID - 44483

Date Issued - 04 March 2024

Closing Date - 22 March 2024

Machine Used - FACSLytic

Trial Comments

This exercise was issued to 77 participants of which 57 (74%) returned results at the time of report generation. Of the non returning centres there were 4 extension requests and 2 pre notified non return. This is version 2.0.0 and replaces version 1.0.0 which contained erroneous action notifications.

Sample Comments

This sample contained stabilised whole blood and plasma cell material.

Recherche de la MRD par analyses moléculaires

ASO-qPCR (allele-specific oligonucleotide quantitative PCR)

- Principe : Recherche d'un clone plasmocytaire par détection et quantification d'un réarrangement spécifique de la région variable de l'immunoglobuline
 - Ces séquences clonotypiques, uniques pour chaque patient, servent de marqueurs moléculaires permettant de suivre le clone pathologique
 - 1) Identification d'un réarrangement clonotypique initial
 - 2) Conception d'amorces spécifiques (ASO) au patient
 - 3) Réalisation de la PCR quantitative (qPCR)

ASO-qPCR (allele-specific oligonucleotide quantitative PCR)

- Sensibilité : 1.10^5
- Spécificité : élevée si amorces bien conçues
- Limites :
 - Processus long et laborieux ($><$ NGF)
 - Applicabilité chez 50–70 % des patients (myélome multiple) à cause d'hypermutations somatiques des gènes codant pour les immunoglobulines
 - Nécessité d'un échantillon initial ($><$ NGF) et conception d'amorces spécifiques ($><$ NGS)

NGS (next-generation sequencing)

- Principe : Recherche d'un clone plasmocytaire par détection et quantification des réarrangements spécifiques de la région variable des immunoglobulines
 - Utilisation d'un ensemble d'amorces consensuelles afin d'amplifier tous les segments réarrangés des gènes d'immunoglobuline dans l'échantillon
 - L'ADN est ensuite séquencé et les séquences clonotypiques dominantes sont identifiées
 - Ces séquences sont ensuite recherchées et quantifiées dans les échantillons de suivi
- LymphoSIGHT (Adaptive) et LymphoTrack (Invivoscribe) sont les plateformes principalement utilisées

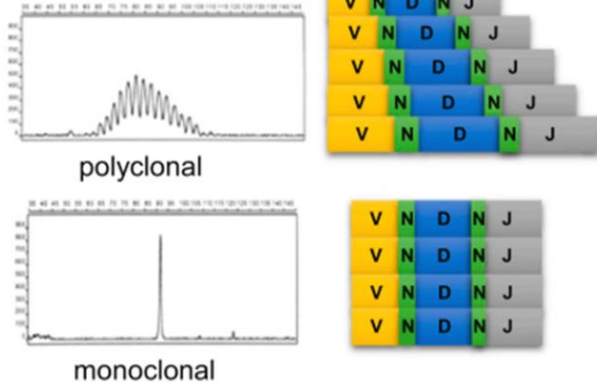
NGS (next-generation sequencing)

- Sensibilité : 1.10^5
- Applicabilité bien meilleure que ASO qPCR
 - Près de 95 % des patients présentent une séquence clonotypique identifiable
- Le gold-standard actuellement (avec NGF)
 - Avantage de pouvoir travailler sur échantillon frais ou congelé ($><$ NGF)
 - Méthode + utilisé pour les études multicentriques sur des larges cohortes
 - Pas besoin de concevoir des amorces patients-spécifiques ($><$ ASO qPCR)
- Limites :
 - Coût ($><$ NGF)
 - Accessibilité de cette technique au laboratoire ($><$ NGF)
 - Nécessite un échantillon initial ($><$ NGF)

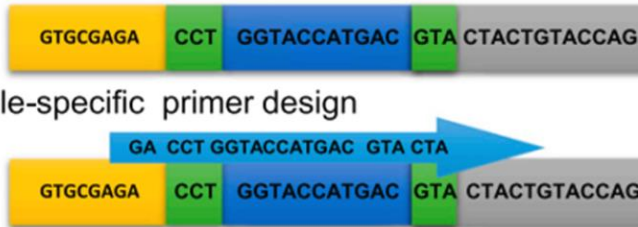
A Principle of allele-specific RQ-PCR

Clonal immunoglobulin heavy chain rearrangement

1. Consensus-PCR



2. Sequencing



3. Allele-specific primer design

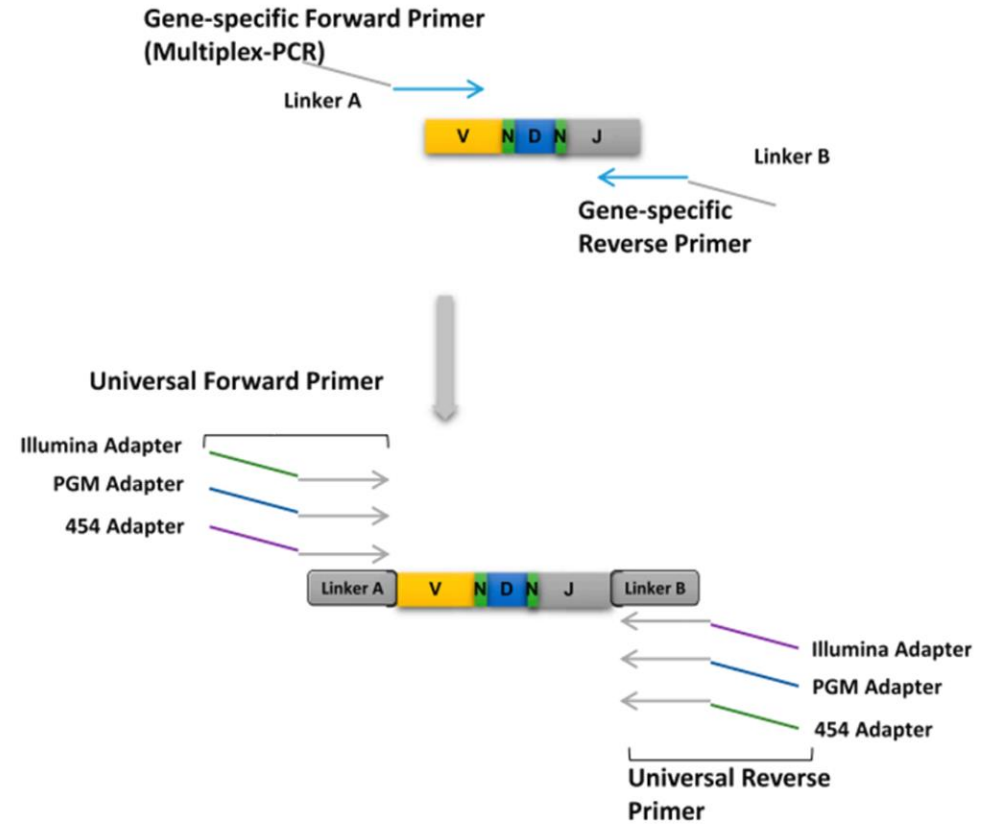


4. Allele-specific RQ-PCR



Tumorspecific assay

B Platform-independent high throughput sequencing



Comparaison des techniques de recherche de MRD

Comparaison des techniques de recherche de MRD

- Le test idéal
 - Bonne applicabilité
 - Utilisable chez tous les patients
 - Bonne sensibilité
 - Bonne spécificité
 - Bonne faisabilité
 - TAT rapide
 - Accessibilité de la technique pour le laboratoire
 - Coût gérable
- Le NGS et le NGF, sans pouvoir répondre à la totalité des critères, sont pour l'instant les deux meilleures solutions

	Allele-specific oligonucleotide qPCR	MFC	VDJ sequencing
Applicability	60–70%	Nearly 100%	≥90%
Need for baseline sample	Yes, requires production of patient-specific probes	Not required; abnormal plasma cells can be identified in any sample by their distinct immunophenotypic pattern vs normal plasma cells	Baseline samples required for identification of the dominant clonotype; alternatively, a stored sample from a time point with detectable disease can be used to define baseline status
Sample requirements	<1 million cells	>5 million cells	<1 million cells; higher numbers improve sensitivity
Sample processing	Can be delayed; can use both fresh and stored samples	Needs assessment within 24–48 h; requires a fresh sample	Can be delayed; can use both fresh and stored samples
Sample quality control	Not possible. Additional studies required	Immediate with global bone marrow cell analysis	Not possible. Additional studies required
Sensitivity	≥1 in 10 ⁵	≥1 in 10 ⁵	≥1 in 10 ⁵
Information regarding sample composition	No further information available	Detailed information available on leucocyte subsets and their relative distribution	Information about immunoglobulin gene repertoire of B cells in the studied patient samples
Turnaround and complexity	Labour intensive; requires the development of patient-specific primers/probes; can take several days	Can be done in a few hours; automated software available	Can take several days for turnaround; requires intense bioinformatics support. Use of local laboratories could speed up this limitation
Standardisation	Has been done for other diseases (EuroMRD), can be done for myeloma as well	Standardised by the EuroFlow consortium	In process
Availability	Wide*	Most hospitals with four-colour flow cytometry. Eight or more-colour flow cytometry requires more experienced centres/laboratories. Many laboratories have adopted the EuroFlow laboratory protocols and use the EuroFlow MRD tubes	So far limited to one company/platform

*Globally, about 60 MRD laboratories are EuroMRD members and participate twice per year in the external quality assurance rounds. MFC=multiparametric flow cytometry. MRD=minimal residual disease.

Table 3: Comparison of different bone marrow minimal residual disease assessment techniques

Imagerie

Imagerie

- PET-CT
 - Moins sensible que la recherche de MRD par NGF et/ou NGS
 - Reste intéressant chez des patients myélome multiple réfractaire ou en rechute
 - Probabilité « *extramedullary disease* » plus importante (pas détecté par les tests de MRD se réalisant sur ponction de moelle)
- Patients MRD- et imagerie+ c'est très rare et l'impact sur le pronostic n'est pas clair
- Patients MRD- et imagerie- ont les meilleurs outcomes → critère « *imaging plus MRD-negative* »

IMWG MRD criteria (requires a complete response as defined below)

Imaging plus
MRD-negative

MRD negativity as defined by NGF or NGS plus disappearance of every area of increased tracer uptake found at baseline or a preceding PET/CT or decrease to less than that of surrounding normal tissue

Perspectives : Peripheral residual disease (PRD)

PRD « peripheral residual disease »

- MRD a le plus grand impact sur les outcomes du patient lors de la maintenance (ex : si un patient passe de MRD- à MRD+)
 - Elle doit donc être réalisée de façon périodique
 - Invasif pour le patient (sujet âgé fragile)
 - Intérêt à chercher une méthode moins invasive : sang périphérique



Peripheral residual disease (PRD)

PRD par NGF sur sang périphérique

- Recherche de cellules plasmocytaires clonales (phénotype pathologique) circulantes
 - Impact sur la PFS (hazard ratio 5,1 (95%CI 2,9-8,9 ; $P < 0,0001$)
 - Importance d'une mesure périodique
 - Si PRD- soutenue dans le temps
 - PFS >4 ans pour 90% des patients
 - vs 19 mois si PRD se positive à un moment donné
- Pour l'instant, toujours en phase exploratoire

Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Puig N, et al. Blood monitoring of circulating tumor plasma cells by next generation flow in multiple myeloma after therapy. Blood. 2019 Dec 12;134(24):2218-2222.

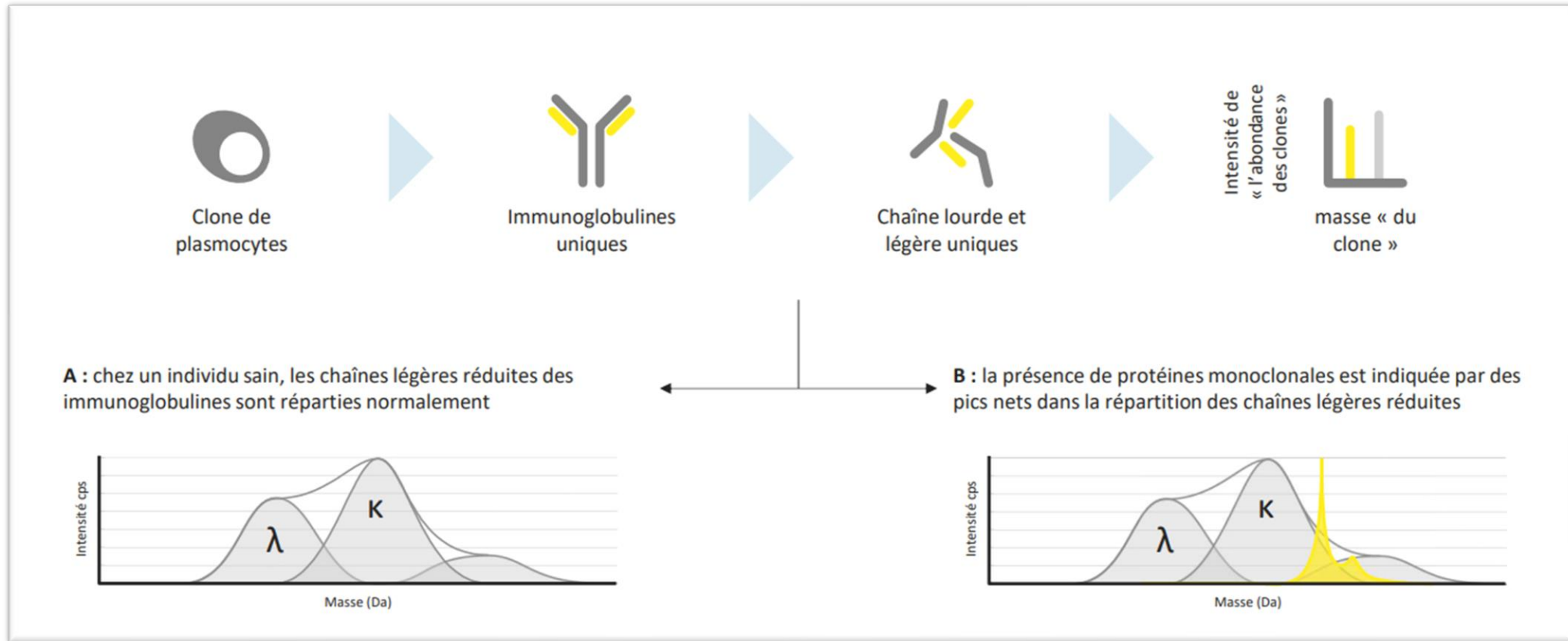
Protéine monoclonale par MS

- But : identification et quantification de la protéine monoclonale par spectrométrie de masse (MS)
 - Via le rapport m/z spécifique pour la protéine monoclonale
- LOD meilleure que l'électrophorèse et l'immunofixation
 - Electrophorèse : 0,1 g/L
 - IF : 0,05 g/L
 - MS : 0,015 g/L
- Moins efficace directement en post-greffe
 - Faux positif : persistance de l'immunoglobuline clonale dans le sérum
 - Concordance avec la MRD augmente lors de la phase de maintenance du traitement

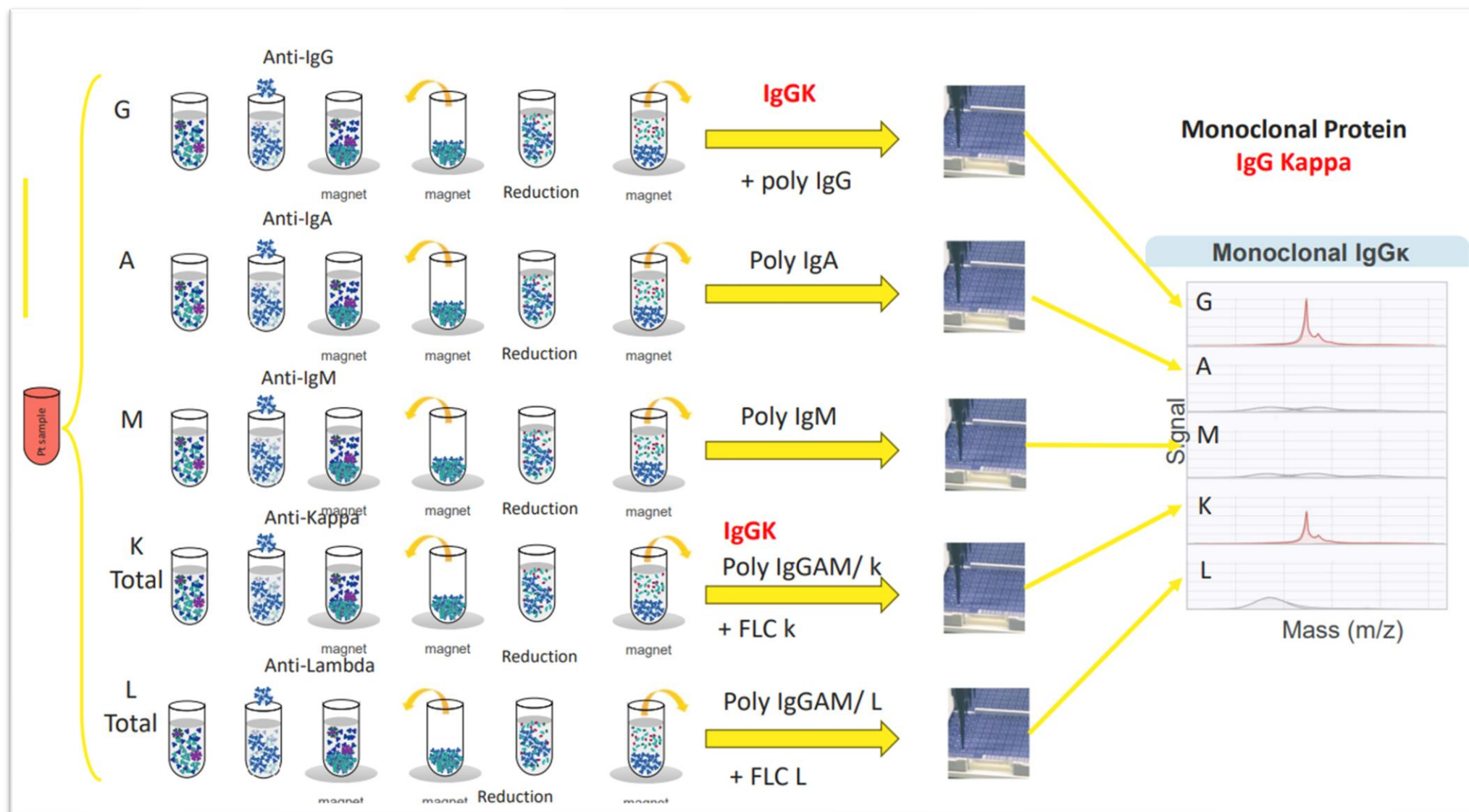
Protéine monoclonale par MS

- Analyseur EXENT® (Binding Site) : mesure quantitative des Ig monoclonales par spectrométrie de masse
- Le système identifie les protéines monoclonales via le rapport m/z
- Principe :
 - Les Ig sont isolées par immuno-purification avec des billes magnétiques spécifiques pour chaque isotype (GAM, κ , λ)
 - Les Ig sont dissociées en chaînes lourdes et chaînes légères qui les composent
 - Analyse des chaînes légères (libres ou qui étaient liées à une chaîne lourde) par spectrométrie de masse
 - On obtient un spectre de masse : intensité des immunoglobulines isolées et réduites en fonction du rapport m/z

Protéine monoclonale par MS

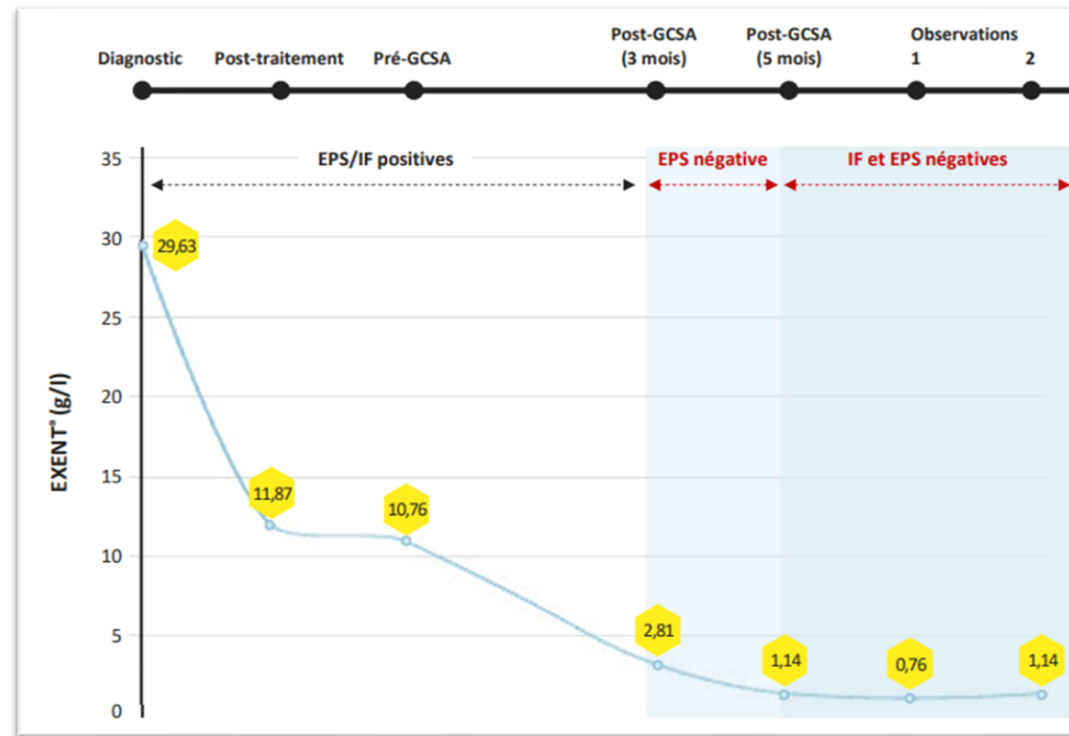


Protéine monoclonale par MS



Protéine monoclonale par MS

- Sensibilité : 0,015 g/L
 - Permet d'identifier une maladie résiduelle chez des patients négatifs en IF
 - Permet de détecter une rechute jusqu'à 5 mois avant l'électrophorèse



Protéine monoclonale par MS

- Permet une détection plus sûre chez les patients atteints de myélome multiple non sécrétant et oligosécrétant
 - MMNS : 1-3% des patients
 - MMOS : 2-3% des patients
 - Difficiles à suivre : imagerie et/ou ponctions de moelle
 - Invasifs, expositions répétées aux radiations,...
 - Etude chez patients MMNS (n =22) et MMOS (n =25)
 - Depuis induction jusqu'à J+100 après autogreffe
 - MS vs électrophorèse, IF et FLC
 - 91% des patients MMNS on une Ig monoclonale détectable en MS
 - *"Overall, 20/39 (51,3%) of the follow-up samples had residual paraprotein detectable by MS"*

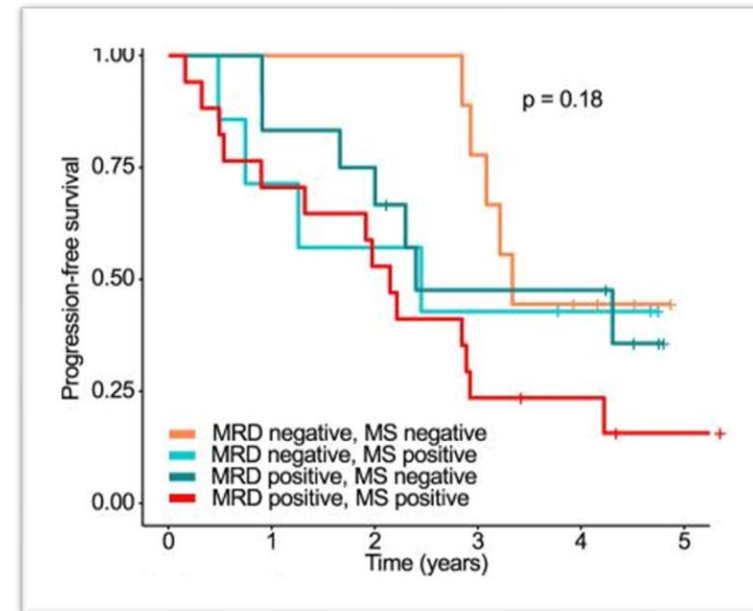
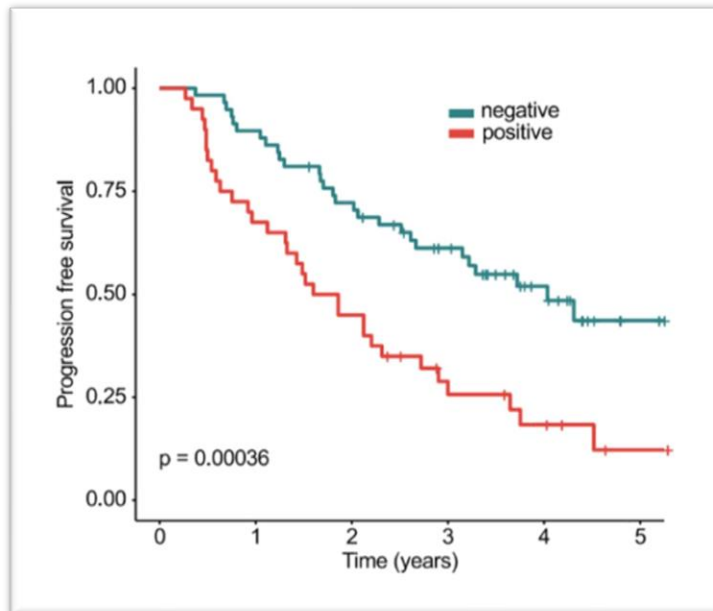
	Number of Samples with Residual Monoclonal Protein Detectable by Serum Protein Electrophoresis and/or Immunofixation (%)	Number of Samples with Monoclonal Protein Detectable by MALDI-TOF MS (%)	Number of Samples with an Abnormal FLC ratio (%)
NSMM (n=22)			
Post Cycle 1 (n=15)	na	11 (73.3)	9 (60.0)
Post Induction (n=11)	na	5 (45.5)	1 (9.1)
Day+42 Post ASCT (n=5)	na	2 (40.0)	0 (0)
Day+100 Post ASCT (n=8)	na	2 (25)	1 (12.5)
Oligo-secretory Myeloma (n=25)			
Post Cycle 1 (n=19)	18 (94.7)	19 (100)	7 (36.8)
Post Induction (n=11)	8 (72.7)	9 (81.8)	5 (45.5)
Day+42 Post ASCT (n=4)	3 (75.0)	3 (75.0)	2 (50.0)
Day+100 Post ASCT (n=4)	1 (25.0)	2 (50.0)	2 (50.0)

Giles HV, Cook MA, Drayson MT, et al. Redefining nonmeasurable multiple myeloma using mass spectrometry. Blood. 2022 Feb 10;139(6):946-950.

Protéine monoclonale par MS

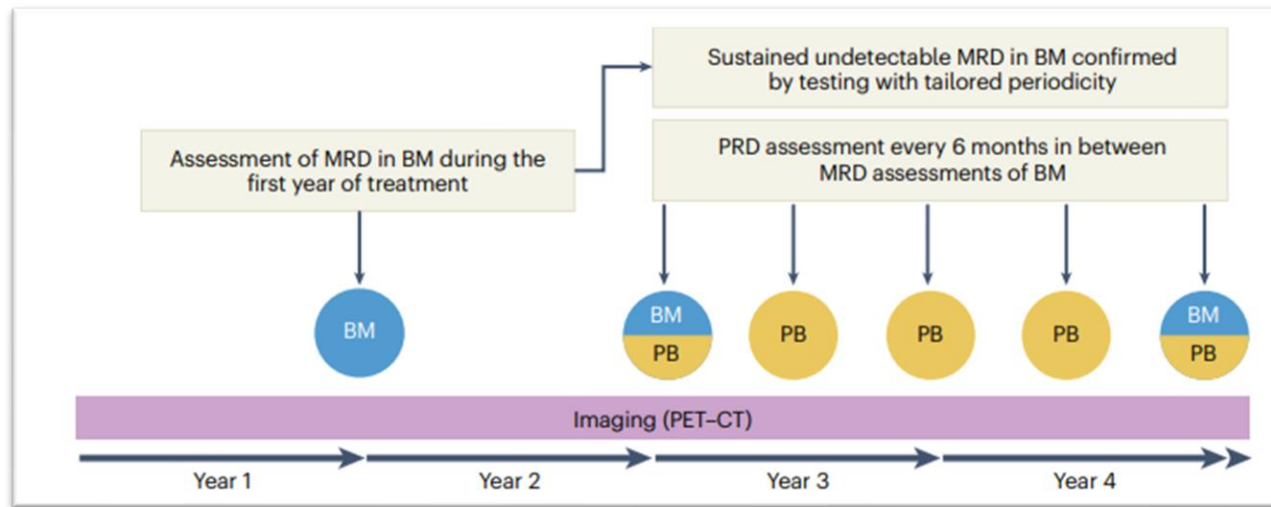
- Etude sur 480 patients avec nouveau diagnostic de MM et éligibles à l'autogreffe
 - Patients en réponse complète
 - Identification d'une Ig monoclonale chez 41% des patients
 - MS positive (PFS 1,7 ans) vs. MS négative (PFS 4,0 ans)
 - Combinaison MS- et MRD- offre la meilleure PFS (overlap)
 - Combinaison MS+ et MRD+ offre la pire PFS

Approche combinée complémentaire



Algorithme pour PRD et MRD

- Actuellement, la ponction de moelle reste le gold-standard (surtout lors des phases précoces de traitement)
- A l'avenir : remplacement de certaines ponctions médullaires par du PRD ?? (dans les phases tardives du traitement)



- MRD sur ponction de moelle tous les 24 mois
- PRD sur sang périphérique tous les 6 mois

Paiva, B., Shi, Q., Puig, N. *et al.* Opportunities and challenges for MRD assessment in the clinical management of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* **22**, 424–438 (2025).

Table 2 | Methods of measurable residual disease assessment in multiple myeloma

Method	Target analyte	Sample	Main advantage	Main limitation
Mass spectrometry	Monoclonal component	Serum	Minimally invasive	Long half-life of myeloma cell-derived monoclonal immunoglobulin proteins can result in false-positive results
NGF	Phenotypically aberrant and clonal plasma cells	Bone marrow or peripheral blood	Does not require baseline sample	Samples must be processed within 24–48h
NGS	Cells with a clonal BCR (that is, clonotypic V(D)J gene rearrangements)	Bone marrow or peripheral blood	Can be performed using frozen samples	Limited availability outside commercial options, which remain expensive
FDG PET-CT	Metabolically active cells	Imaging of intramedullary and extramedullary compartments	Assessment of EMD	Not applicable for tumours with low expression of the enzymes responsible for the glycolysis process

Mass spectrometry has emerged as a highly sensitive method for the detection of the myeloma monoclonal component (M protein) in serum. NGF and NGS have high sensitivity for the detection of phenotypically aberrant cells and cells with a clonal BCR, respectively, in peripheral blood and bone marrow; bone marrow remains the sample of choice for measurable residual disease (MRD) assessment using these methods owing to the greater abundance of myeloma cells in that compartment. However, emerging data suggesting that monitoring MRD in peripheral blood (that is, peripheral residual disease) using NGF and NGS is prognostic and might help to reduce the number of bone marrow aspirates that patients are required to endure. PET-CT is currently the method endorsed for monitoring treatment efficacy in both the intramedullary and extramedullary compartments. BCR, B cell receptor; EMD, extramedullary disease; FDG, ¹⁸F-fluorodeoxyglucose; NGF, next-generation flow cytometry; NGS, next-generation sequencing.

Paiva, B., Shi, Q., Puig, N. *et al.* Opportunities and challenges for MRD assessment in the clinical management of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* **22**, 424–438 (2025).

THE MMOVE PROJECT

MRD-testing in Multiple Myeloma in Belgium: data from the MMOVE project (N. Boeckx, MD., PhD. Department of Laboratory Medicine University Hospitals Leuven)

MMOVE PROJECT

- Projet initié en 2022
- But d'encourager et de soutenir la recherche de MRD de façon durable chez des patients atteints de myélome multiple en Belgique
- 5 centres de références :

- 3 pour le NGF

- UZ Leuven
- UZ Gent
- CHU UCL Namur



- 2 pour le NGS

- UZ Brussel
- CHU Liège



MMOVE PROJECT

MRD Workflow

Minimal Residual Disease

CHU UCL Namur - Montgodinne

Next generation flow (NGF)

Reference hospital: CHU UCL Namur
Montgodinne
Contact details

Prof. dr. F. Mullier, Ph. Biol. M. Bareille, dr. M.
Kourssaji, Mrs. V. Lepage

Tel laboratory : +32 81 42.32.02

Email: labo.cyts-cmf.g@chuclnamur.uclouvain.be



More information?

Janssen Customer Service Center

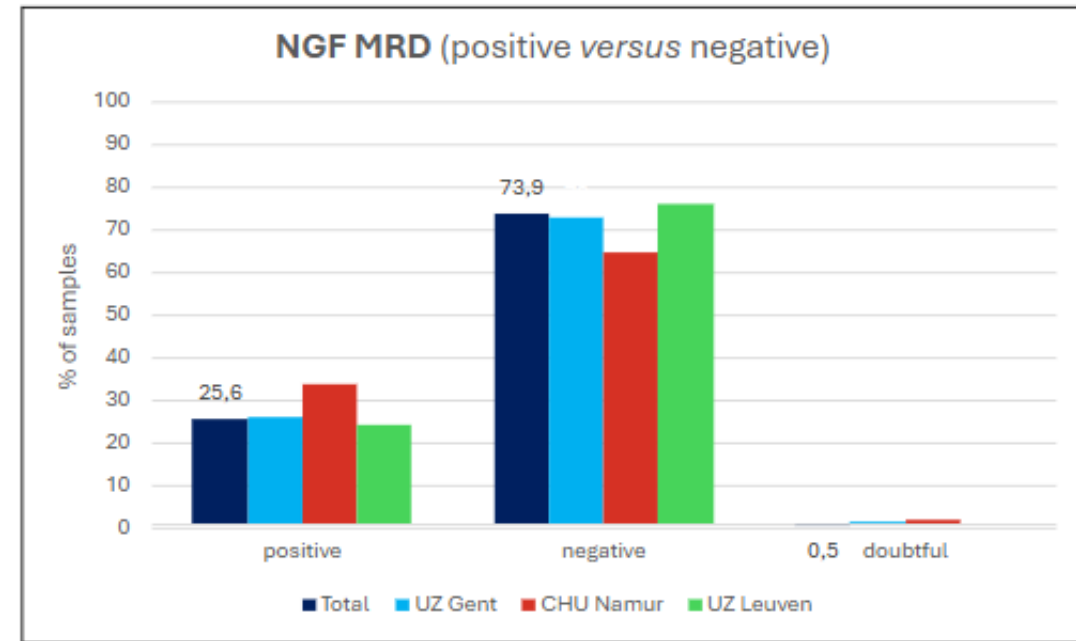
0800 93 377

janssen@jacbe.jnj.com

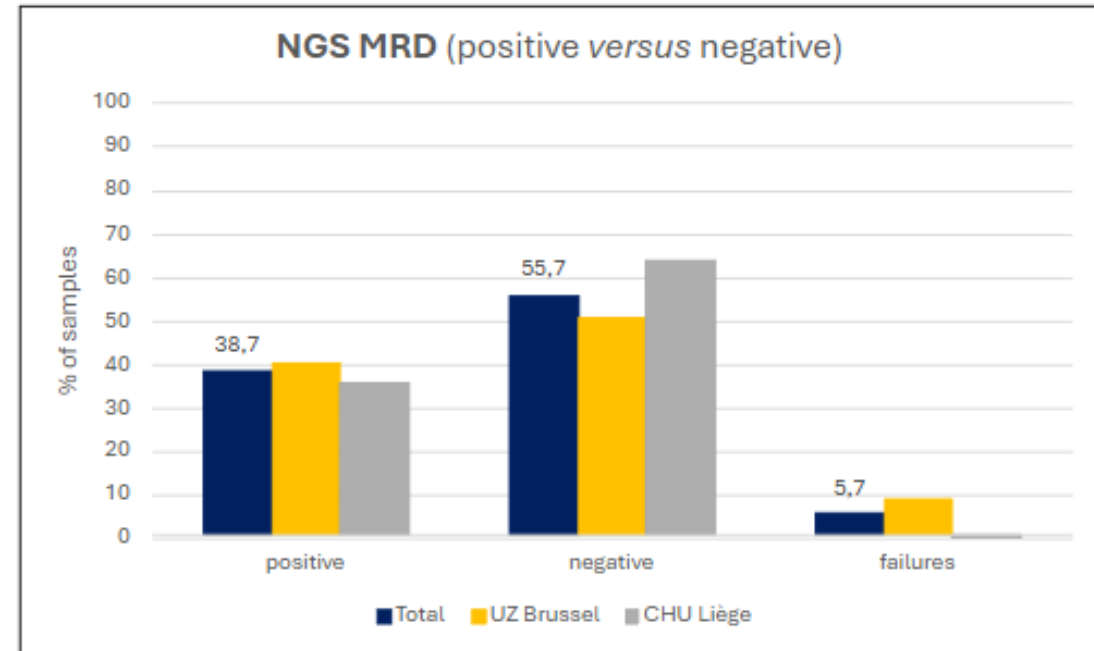
www.janssen.com/belgium

- Patients inclus :
 - Réponse complète stricte (sCR)
 - Premier tube de moelle ponctionné
 - Echantillon analysé endéans les 8 heures (max 24h)
 - NGF
 - 2 tubes 8 couleurs (EuroFlow) : UZ Gent, UZ Leuven
 - 1 tube 10 couleurs (Royston) : CHU UCL Namur
- Les mêmes 10 marqueurs
- NGS
 - LymphoTrack assay (Invivoscribe®)
 - *IGH* FR1, *IGH* FR3, *IGK*

- NGF (n = 437)
 - UZ Leuven (n = 309)
 - UZ Gent (n = 66)
 - CHU UCL Namur (n = 62)
- MRD- : n = 323 (73,9%)
- MRD+ : n = 112 (25,6%)
- MRD douteuse : n = 2 (0,45%)
- Sensibilité de 0,001% (1.10^5) dans 89% des cas



- NGS (n = 106)
 - UZ Brussel (n = 67)
 - CHU Liège (n = 39)
- MRD- : n = 59 (55,6%)
- MRD+ : n = 41 (38,7%)
- Sample failed: n = 6 (5,6%)
- Sensibilité de 0,001% (1.10^5) dans 83% des cas



- Recherche de MRD est faisable en pratique réelle (réseau de centre de référence et flux logistique clairement établi avec les centres périphériques)
- Points d'amélioration
 - Premier tube de moelle ponctionné
 - Sensibilité 1.10^5
 - Stockage échantillon diagnostic pour NGS
- Nécessité d'un remboursement adéquat

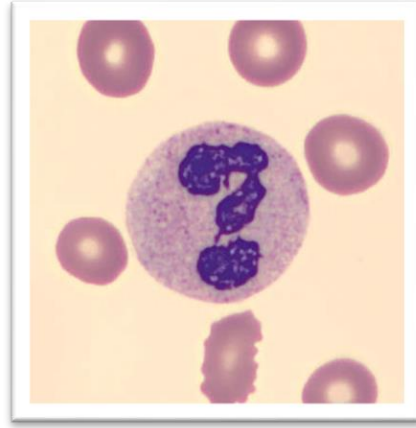
Conclusions

Conclusions (1/2)

- La MRD est un outil pronostique majeur et tend à devenir un outil décisionnel thérapeutique.
- NGS et NGF sont les deux gold standards actuels
 - NGS
 - Avantage : travail sur échantillon frais ou congelé
 - Limite : accessibilité de la technique
 - NGF
 - Avantage : pas besoin d'un échantillon initial
 - Limite : analyse doit être réalisée dans les 24 heures
 - Réalisable avec une combinaison 1 tube 10 couleurs
 - Gain de temps et diminution des coûts

Conclusions (2/2)

- Les méthodes de recherche de MRD doivent être standardisées
 - Permet une bonne comparaison des études cliniques entre elles
 - Cfr critères IMWG pour faire de la MRD
- Nécessité d'un remboursement adéquat
- Perspectives : PRD (*peripheral residual disease*)
 - Les développements futurs viseront à combiner la MRD médullaire et les approches non invasives (ex : PRD par recherche protéine monoclonal en spectrométrie de masse) pour un suivi plus global du myélome multiple
 - Algorithme combinaison MRD et PRD à évaluer dans des études cliniques



Merci pour votre attention : des questions ?

Références

- Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. *International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma*. Lancet Oncol. 2016 Aug;17(8):e328-e346.
- Mai EK, Huhn S, Miah K, Poos AM, Scheid C, Weisel KC, Bertsch U, Munder M, Berlanga O, Hose D, Seckinger A, Jauch A, Blau IW, Hänel M, Salwender HJ, Benner A, Raab MS, Goldschmidt H, Weinhold N. Implications and prognostic impact of mass spectrometry in patients with newly-diagnosed multiple myeloma. Blood Cancer J. 2023 Jan 4;13(1):1.
- Paiva, B., Shi, Q., Puig, N. et al. Opportunities and challenges for MRD assessment in the clinical management of multiple myeloma. Nat Rev Clin Oncol 22, 424–438 (2025).
- Royston DJ, Gao Q, Nguyen N, et al. *Single-Tube 10-Fluorochrome Analysis for Efficient Flow Cytometric Evaluation of Minimal Residual Disease in Plasma Cell Myeloma*. Am J Clin Pathol. 2016 Jul;146(1):41-9.
- Giles HV, Cook MA, Drayson MT, Cook G, Wright NJ, North SJ, Harding S, Cairns DA, Hockaday A, Kaiser MF, Moss P, Davies FE, Morgan GJ, Jackson G, Pratt G. Redefining nonmeasurable multiple myeloma using mass spectrometry. Blood. 2022 Feb 10;139(6):946-950.
- Munshi NC, Avet-Loiseau H, Anderson KC, et al. *A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma*. Blood Adv. 2020 Dec 8;4(23):5988-5999
- Costa LJ, Chhabra S, Medvedova E, et al. Daratumumab, Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone With Minimal Residual Disease Response-Adapted Therapy in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2022 Sep 1;40(25):2901-2912
- Wood B, Jevremovic D, Bene MC, Yan M, Jacobs P, Litwin V; on behalf of ICSH/ICCS working group. *Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS - Part V - Assay performance criteria*. Cytometry Part B 2013; 84B: 315–323.
- Rodríguez-Lobato LG, Pereira A, Fernández de Larrea C, et al. *Real-world data on survival improvement in patients with multiple myeloma treated at a single institution over a 45-year period*. Br J Haematol. 2022 Feb;196(3):649-659.
- Vergnolle, I., Rieu, J., Avet-Loiseau, H., Corre, J. et Vergez, F. (2019) . *Immunophénotypage du myélome multiple : validation de la méthode*. Annales de Biologie Clinique, Vol. 77(2), 197-217.
- Hoster E, Pott C. Minimal residual disease in mantle cell lymphoma: insights into biology and impact on treatment. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2016 Dec 2;2016(1):437-445.
- Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, Monreal M, de Tute R, Vergilio J.-A, Rawstron A C. and Paiva B. Consensus Guidelines on Plasma Cell Myeloma Minimal Residual Disease Analysis and Reporting. Cytometry Part B 2016; 90B: 31–39.
- UpToDate : *Multiple myeloma: Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis*. Jacob P Laubach, MD, MPP.
- Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) /validation (portée B) des méthodes de Biologie médicale. SH GTA 04 - Révision 02
- CBIP (Centre belge d'information pharmacothérapeutique)
- Modes opératoires du CHU UCL Namur