



COLLÈGE NATIONAL DE BIOCHIMIE DES HÔPITAUX

Organisme de formation continue n°82 07 00551 07

www.cnbh.fr

Journée Régionale Région Ouest 2022 – 15/11/2022

**DECLARATION D'INTERET
DANS LE CADRE DE MISSIONS DE FORMATION
RÉALISÉES POUR LE CNBH**

Dr ...Thomas DEJOIE.....

Exerçant à / au CHU De Nantes..... (Établissement – service)

déclare sur l'honneur

ne pas avoir d'intérêt, direct ou indirect (financier), avec les entreprises pharmaceutiques, du diagnostic ou d'édition de logiciels susceptible de modifier mon jugement ou mes propos, **concernant le sujet et les DMDIV présentés.**

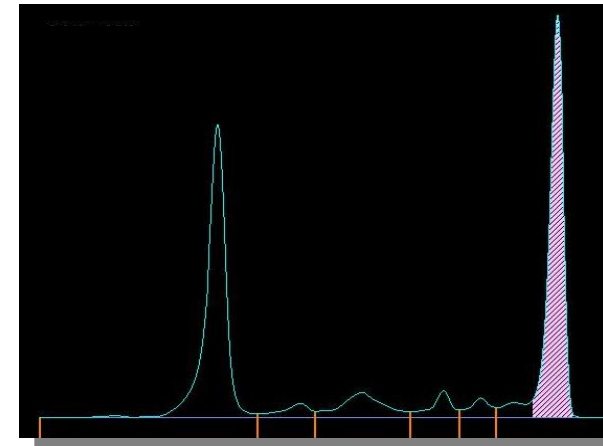
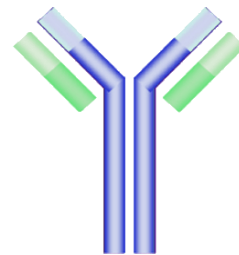
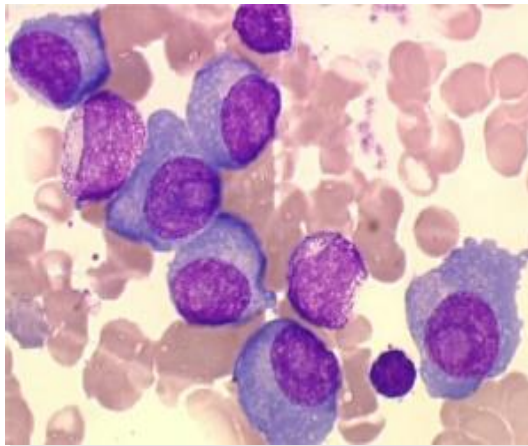
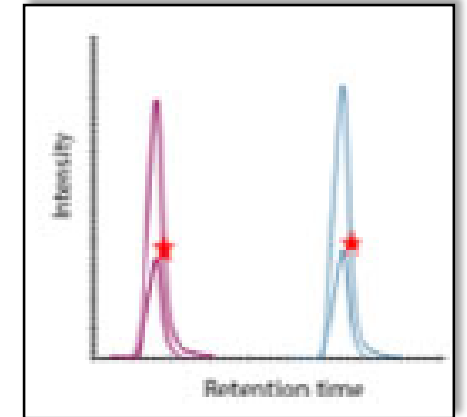
Citer ici les liens mentionnés sur la déclaration s'il en existe, sinon supprimer cette mention



Spectrométrie de masse dans le myélome : état de l'art



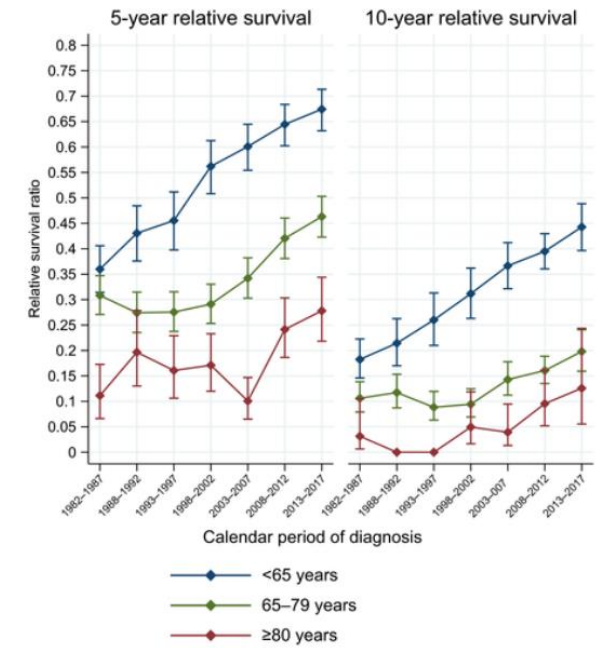
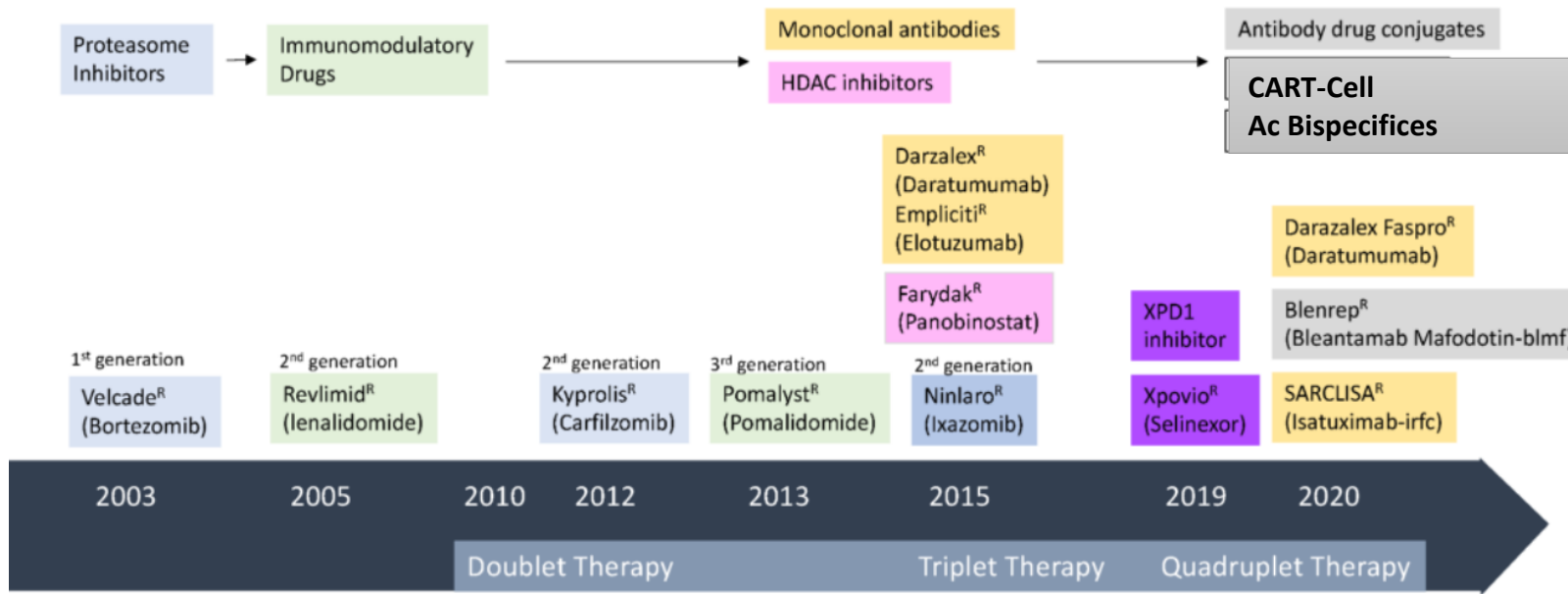
CNBH, le 15 novembre 2022



MS (Mass spectrometry) et Myélome multiple (MM) Contexte et concept

- **Contexte clinique**

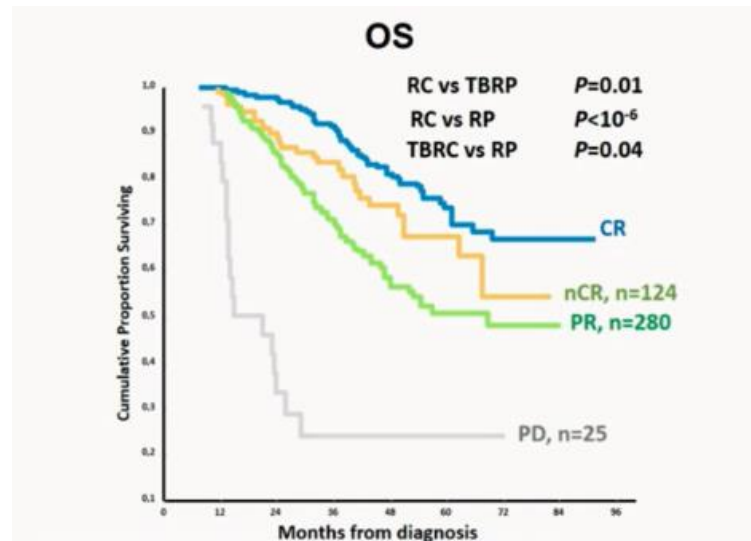
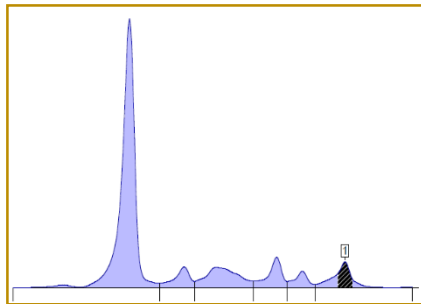
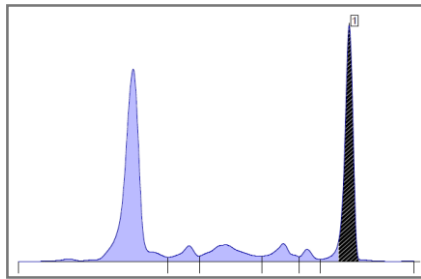
- Améliorations thérapeutiques considérables => Survie



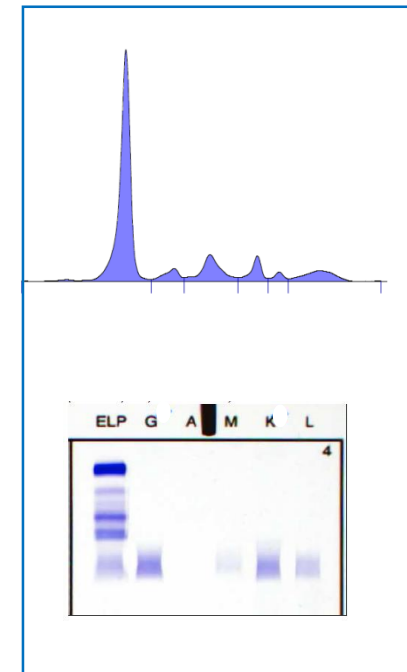
MS (Mass spectrometry) et Myélome multiple (MM) Contexte et concept

- **Contexte clinique**

- Améliorations thérapeutiques considérables => **corrélation réponse** <-> survie



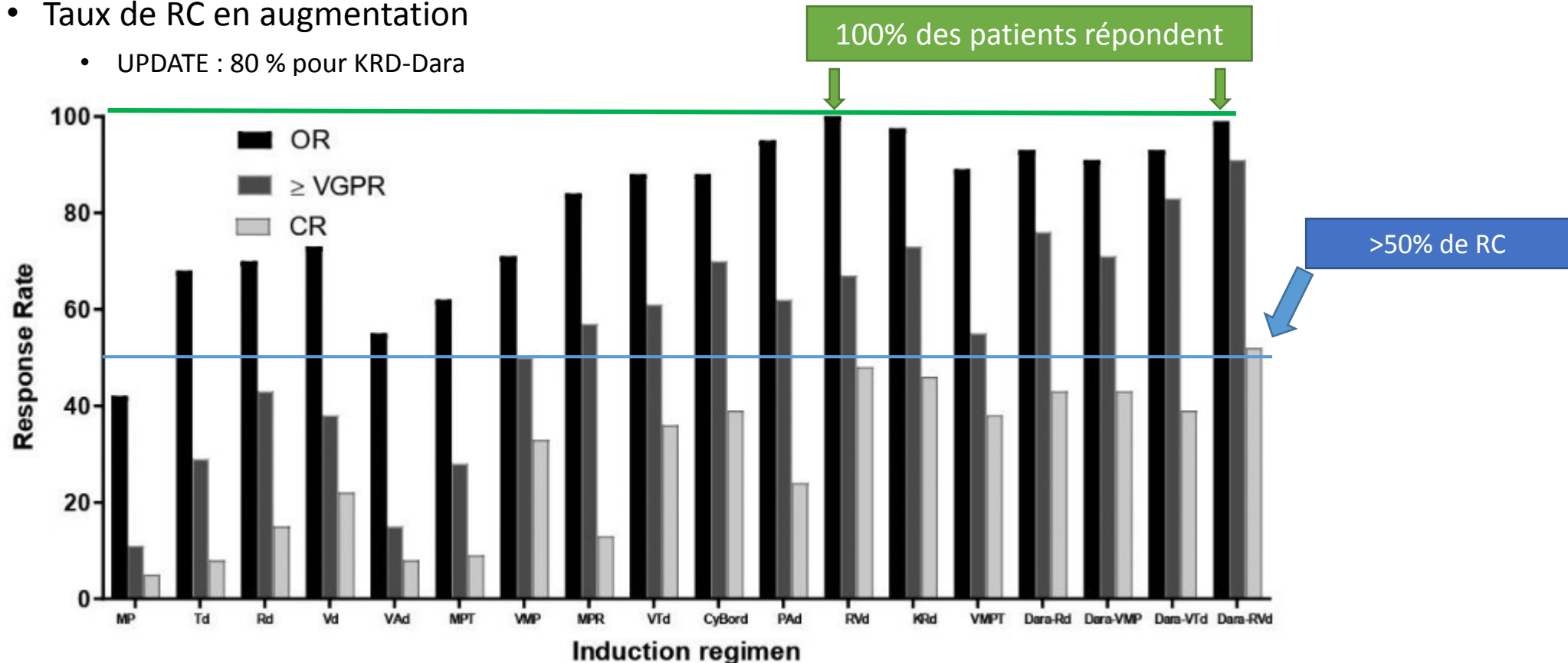
	CR	nCR	PR	PD
Medians EFS, months	61	40	34	13
Medians OS, months	NR	NR	61	15



MS (Mass spectrometry) et Myélome multiple (MM) Contexte et concept

- **Contexte clinique**

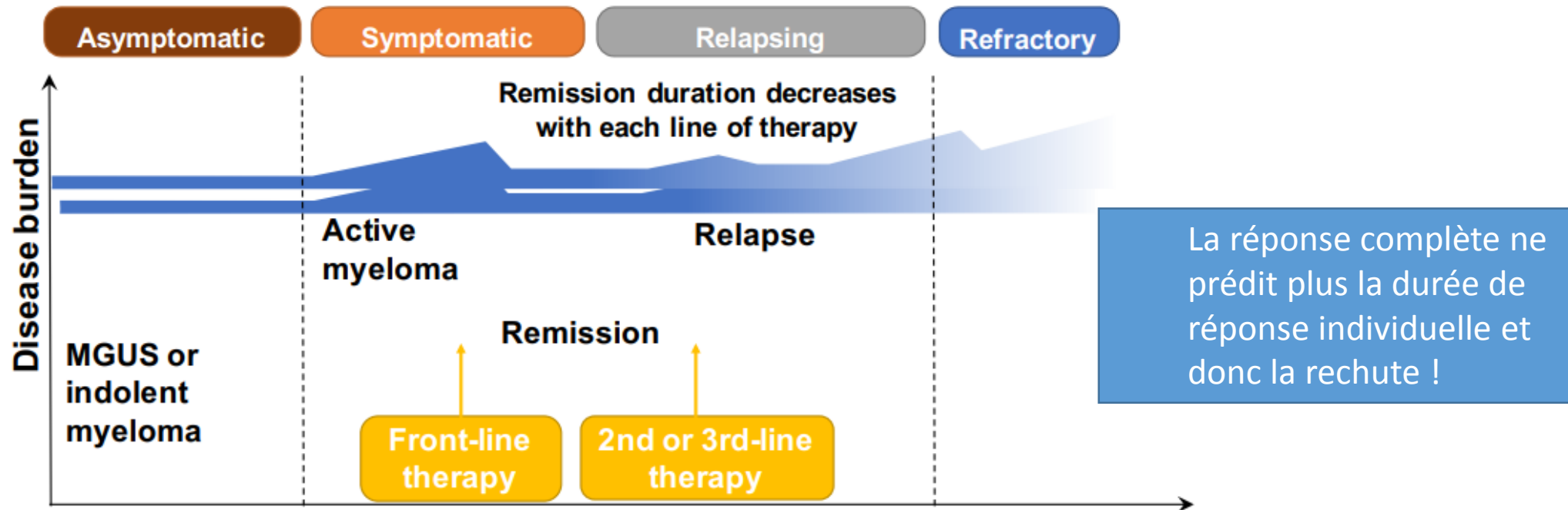
- Améliorations thérapeutiques considérables => **corrélation réponse** <-> survie
- Taux de RC en augmentation
 - UPDATE : 80 % pour KRD-Dara



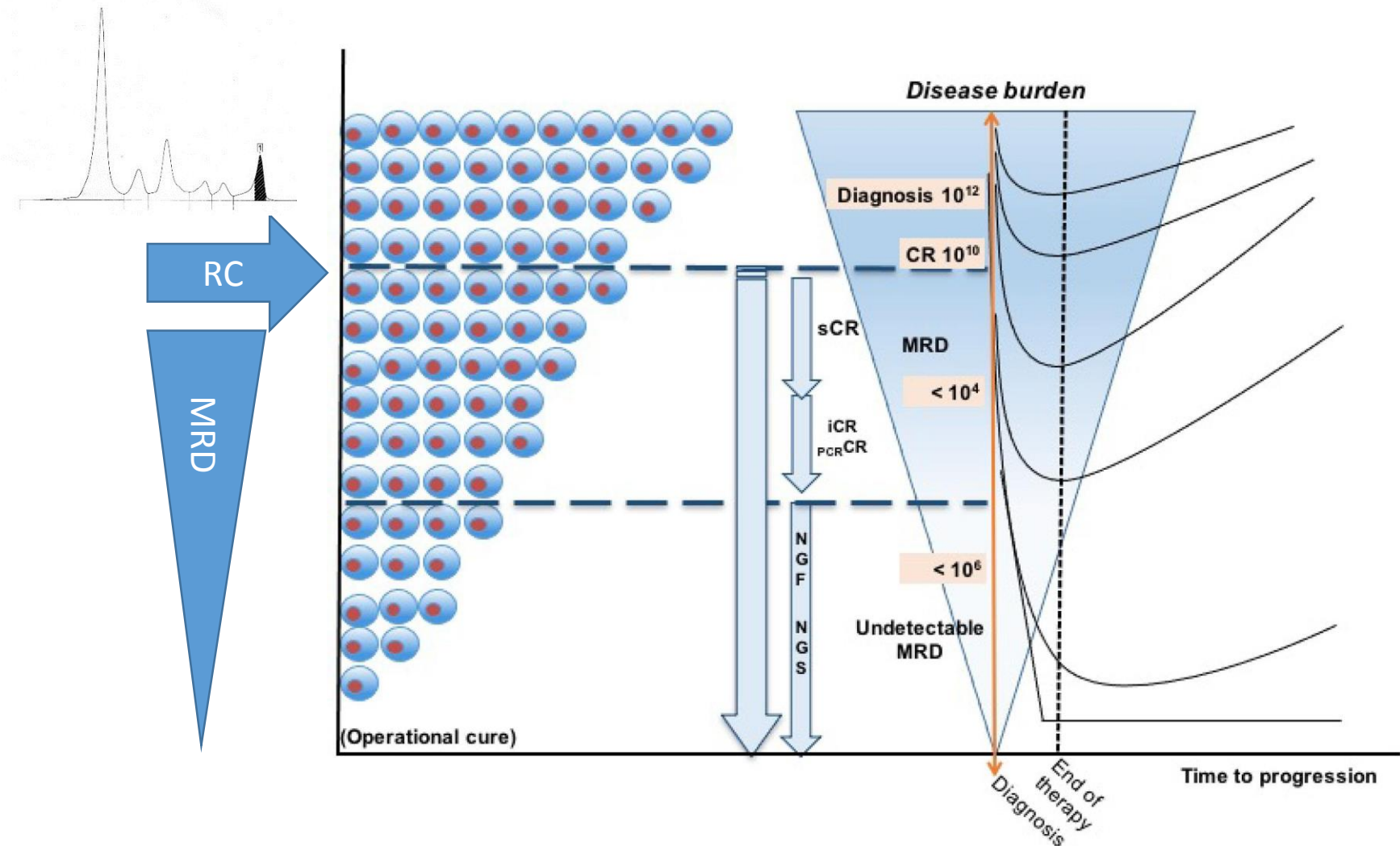
MS (Mass spectrometry) et Myélome multiple (MM) Contexte et concept

- **Contexte clinique**

- Améliorations thérapeutiques considérables => survie
- Taux de RC (max 80%)
- Mais rechute à terme (2->10 ans) => pas de guérison



Au-delà des réponses classiques : maladie résiduelle minimale MRD



MS (Mass spectrometry) et Myélome multiple (MM) Contexte et concept

Meta-analyse 44 études_8098 patients

• Contexte clinique

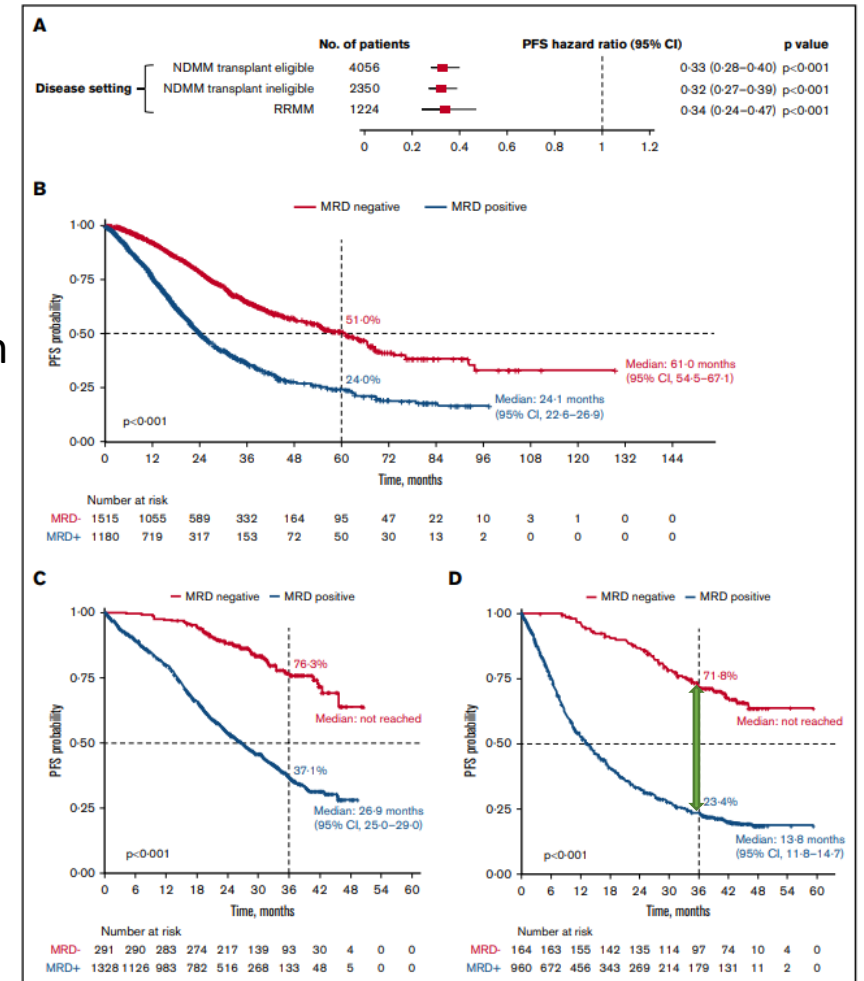
- Améliorations thérapeutiques considérables => survie
- Taux de RC (max 80%)
- Mais rechute à terme (2->10 ans) => pas de guérison
- MRD médullaire puissamment corrélée à la survie sans progression NGS et NGF (10^{-5})

Figure D : myélome en rechute ou progression (RRMM)

Après 3 ans de suivi

- 70% des patients MRD négatives sont encore en vie
- 20% dans le groupe MRD positives
- 1 patient sur 5 atteint la MRD négative!

*Très forte valeur pronostique d'une MRD négative pour tout type de patients (greffés, non greffés, en rechute ou réfractaire)
=> MRD médullaire surrogate marker de la survie dans les essais cliniques*



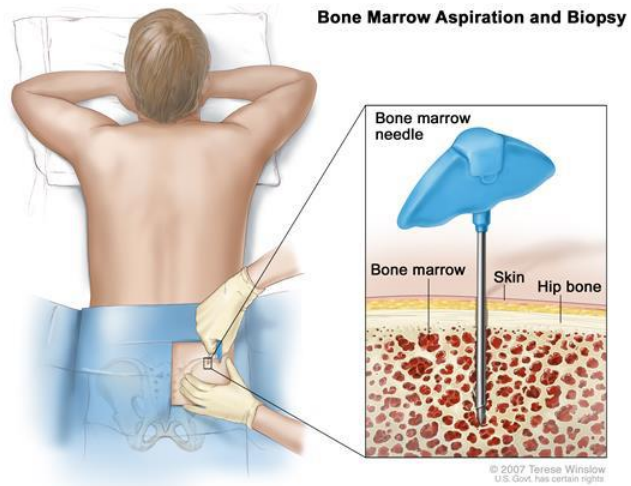
MS (Mass spectrometry) et Myélome multiple (MM) Contexte et concept

- **Contexte clinique**

- Améliorations thérapeutiques considérables => survie
- Taux de RC (max 80%)
- Mais rechute à terme (2->10 ans) => pas de guérison
- MRD médullaire puissamment corrélée à la survie sans progression **MAIS difficultés**

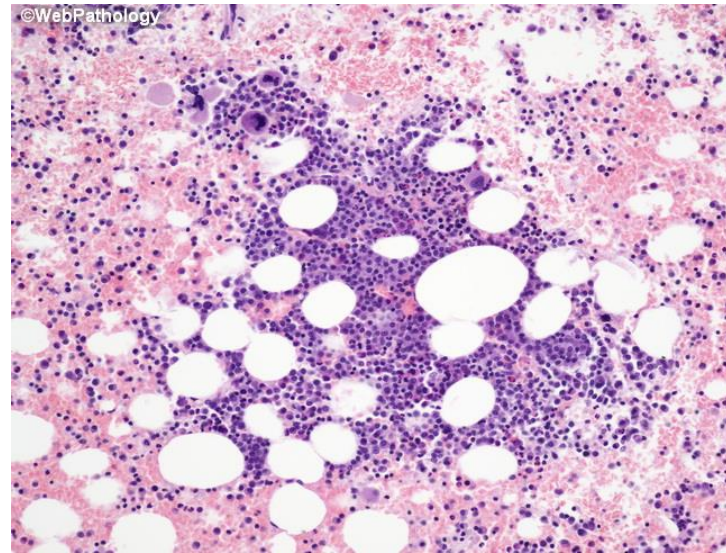
MRD médullaire : difficultés

Procédure invasive

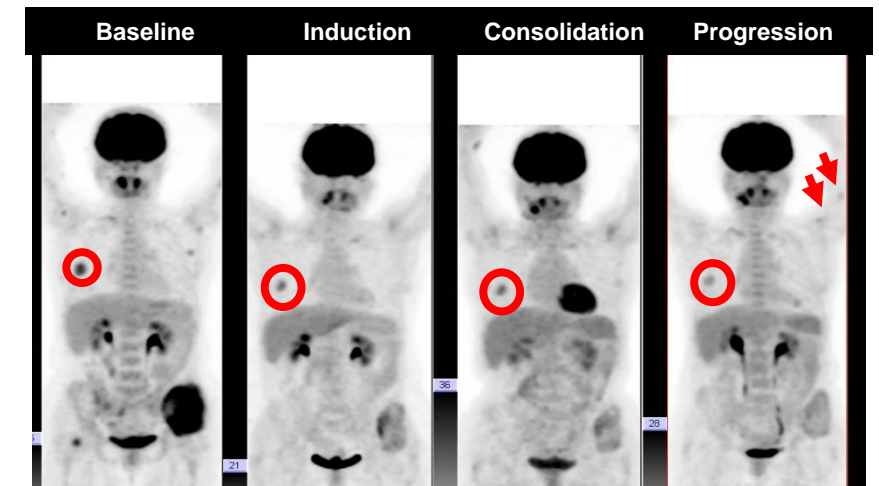


Prélèvement isolé

Infiltration hétérogène



Localisation extramédullaire



Faux négatifs

GEM 2012: 7% OF PATIENTS PROGRESSED WHILST MRD neg

MS (Mass spectrometry) et Myélome multiple (MM) Contexte et concept

- **Contexte clinique**

- Améliorations thérapeutiques considérables => survie
- Taux de RC (max 80%)
- Mais rechute à terme (2->10 ans) => pas de guérison
- MRD médullaire puissamment corrélée à la survie sans progression MAIS difficultés

- **Alternative à l'évaluation médullaire => concept de Biopsie liquide**

- **MRD sanguine**

- CMMC : cellules circulantes...
- cfDNA : cell free DNA...
- **Proteine monoclonale !!**

- **Spectrométrie de masse**

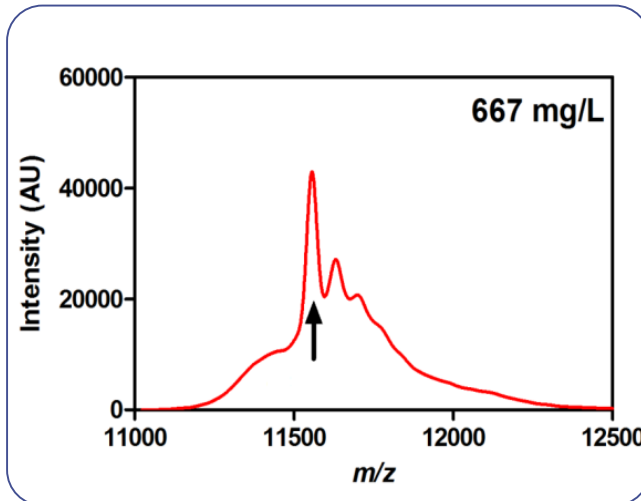
- Performances analytiques : LOD très basse, spécificité « absolue »
- Deux approches dérivées de la protéomique



MS : principe analytique

- Préparation échantillon : isolement physicochimique de la mesurande
- Analyse par spectromètre séparation selon la masse et la charge

Mass spectrometry



- Signal Spécifique : rapport M/Z constant
- Signal quantitatif sous certaines conditions sinon qualitatif

- Analyse de molécules ou
- Analyse de fragments de molécules

Pourquoi utiliser la MS pour la M Proteine?

- Mesurande Ig monoclonale
 - Composition en acides aminés unique
 - Stable au cours du temps
 - Rapport Masse sur charge ou M/Z comme signal spécifique
 - Mesure très spécifique et sensible

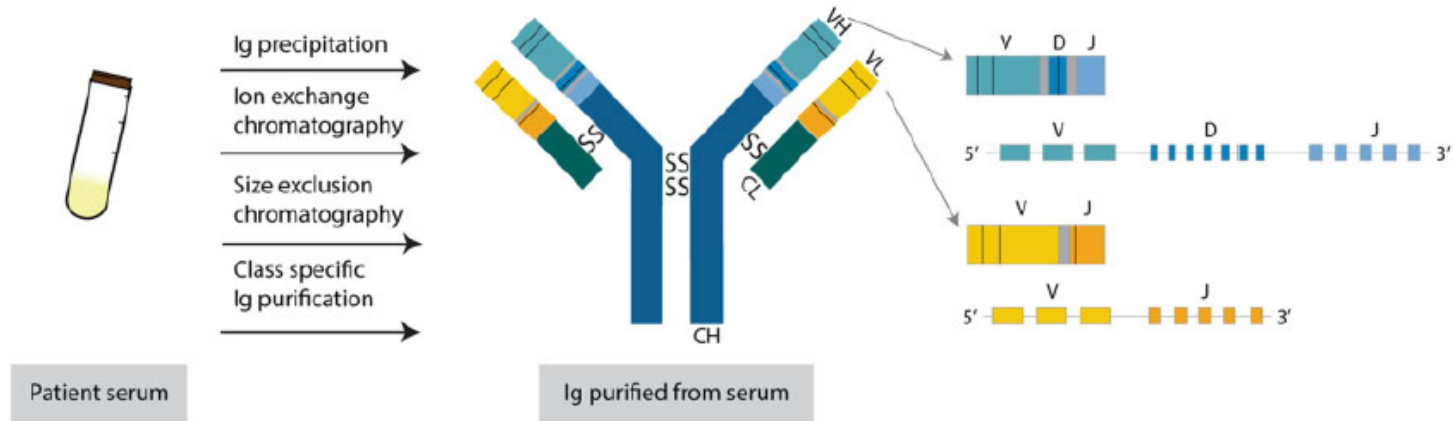
7 ans

Table 1. Comparison of M-protein PEL and IFE Results with the Peak Areas and Molecular Masses Observed for the M-protein by microLC-ESI-Q-TOF MS^a

sampling date	M-spike (g/dL)	IFE	light chain		heavy chain	
			peak area	molecular mass (Da)	molecular mass (Da)	
2/23/2005 ^b	4.35	pos	3 010 899	23 452.64	51 595.07	51 758.27
3/29/2006	0.26	pos	34 839	23 452.10		
4/24/2007	0	neg	↔ 9 301	23 451.78		
10/11/2007	0	neg	↔ 11 496	23 452.31		
4/23/2008	0.54	pos	152 021	23 452.20	51 595.46	51 757.84
5/7/2009	0.43	pos	322 375	23 452.34	51 596.66	51 758.52
7/27/2010	3.24	pos	3 121 072	23 452.50	51 596.56	51 758.91
8/22/2011 ^c	0	neg	↔ 2112	23 452.17		
3/5/2012	0.79	pos	600 281	23 452.50	51 596.44	51 758.74

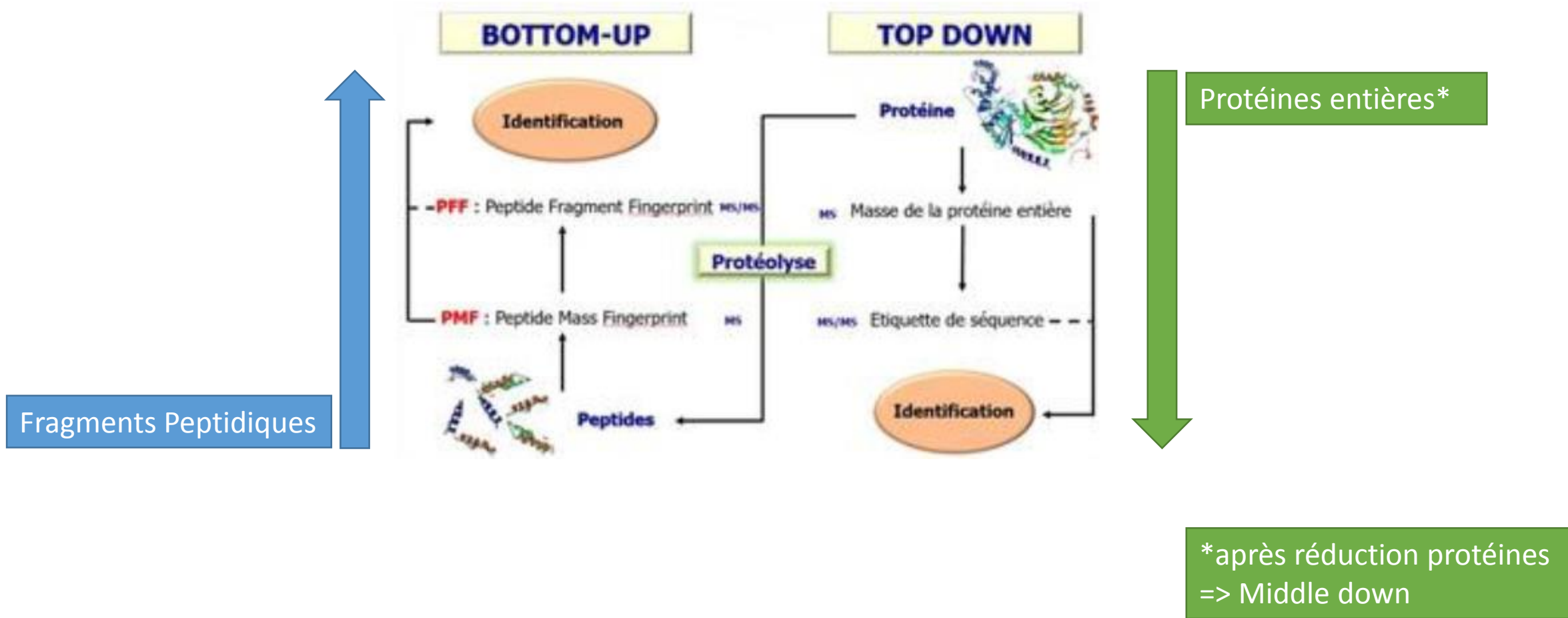
^aResults are from serum samples obtained from a patient diagnosed with multiple myeloma taken over a 7 year period. ^bSample date 2/23/2005 was used in Figure 2. ^cSample date 8/22/2011 was used in Figure 3.

Mass spec : approches méthodologiques

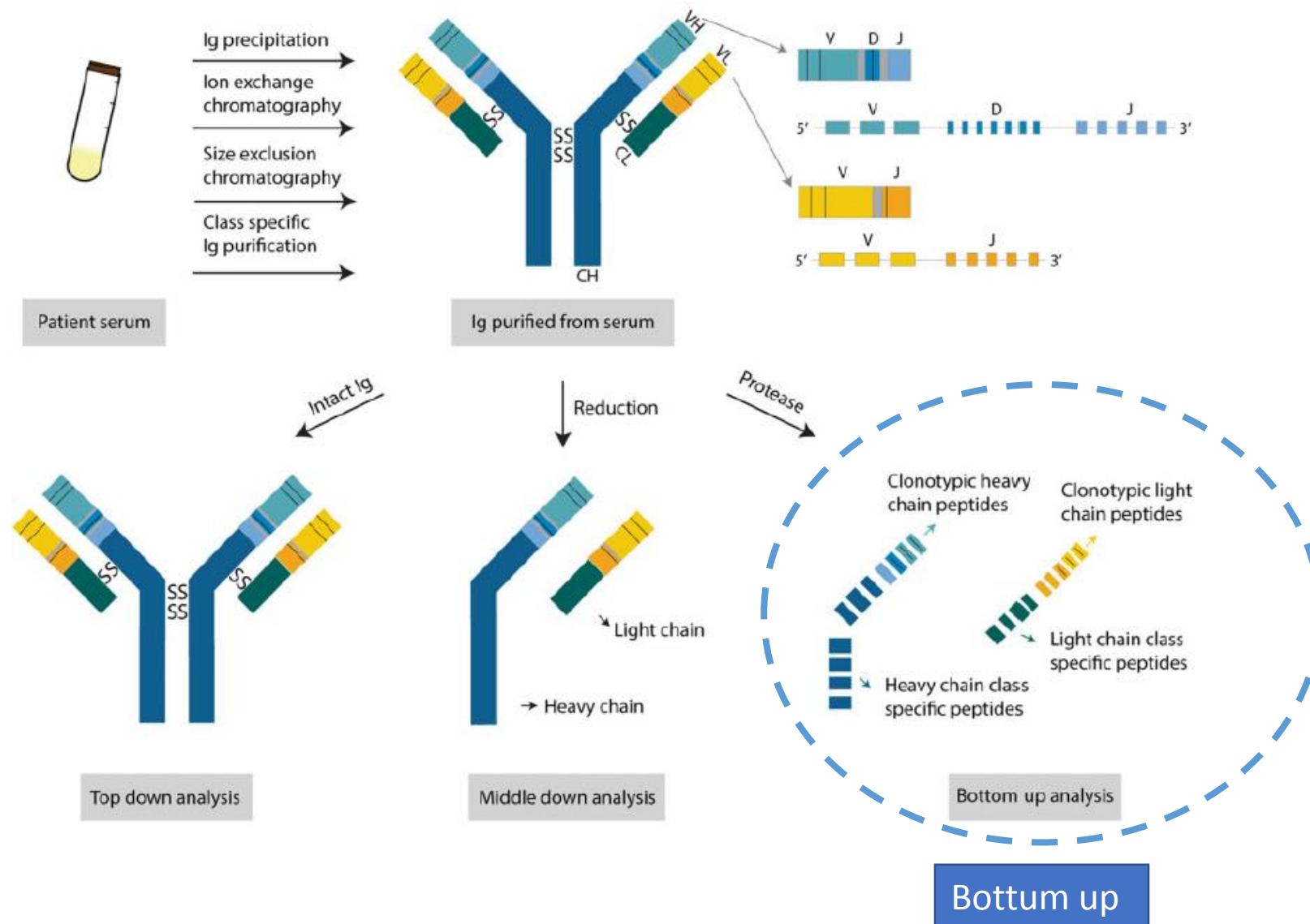


Etape initiale commune : isolement des Ig (totale ou par isotype)

Mass spec : approches méthodologiques



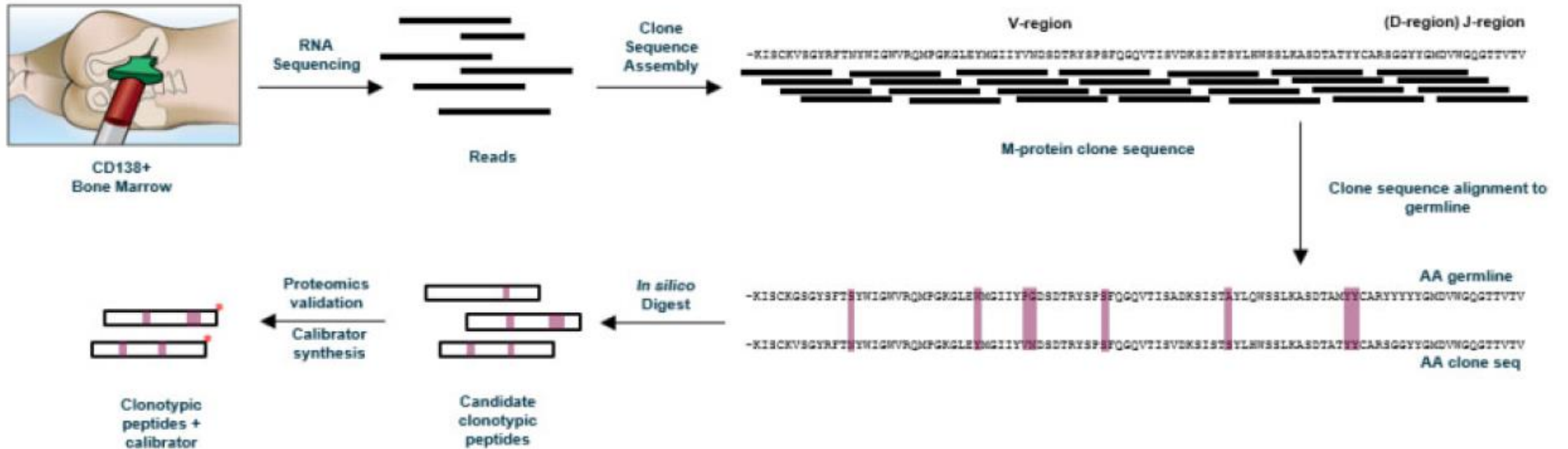
Mass spec : approches méthodologiques



Bottom up MS : approche clonotypique

Etape 1

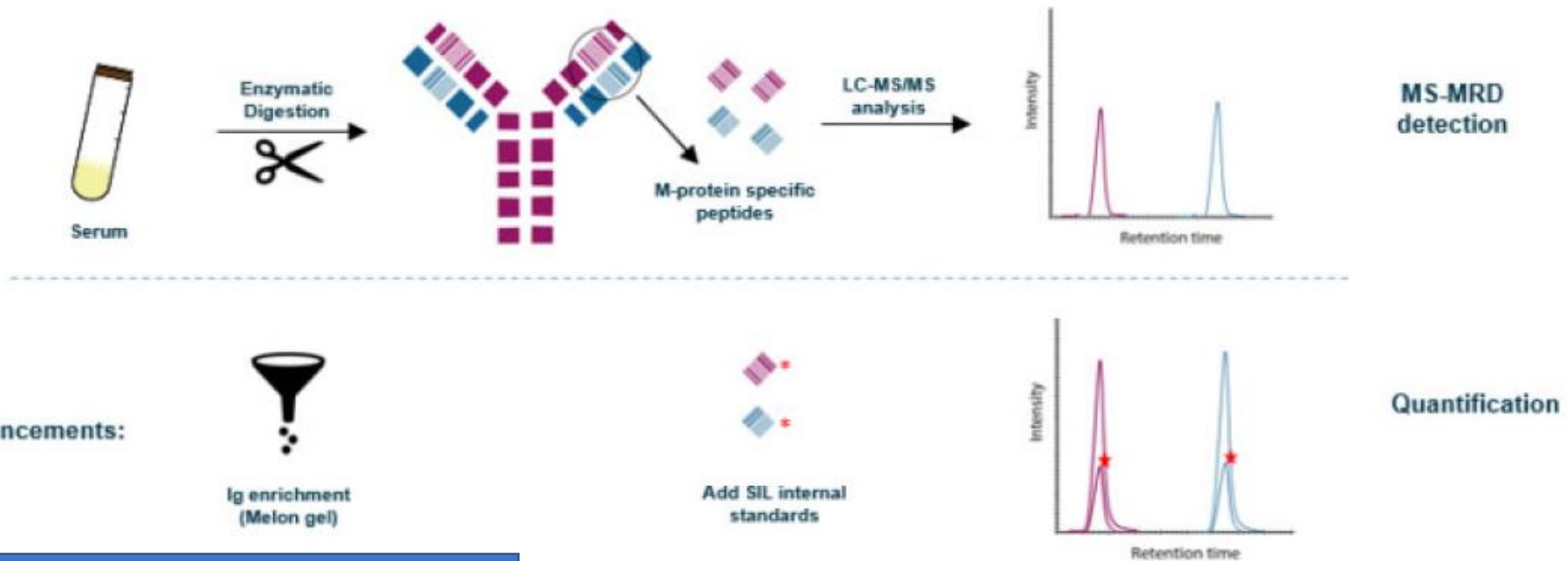
Identification des clonopeptides spécifiques *via* RNA seq ou de novo sequencing* _ clonopeptides candidats validés par protéomique



Bottom up MS : approche clonotypique

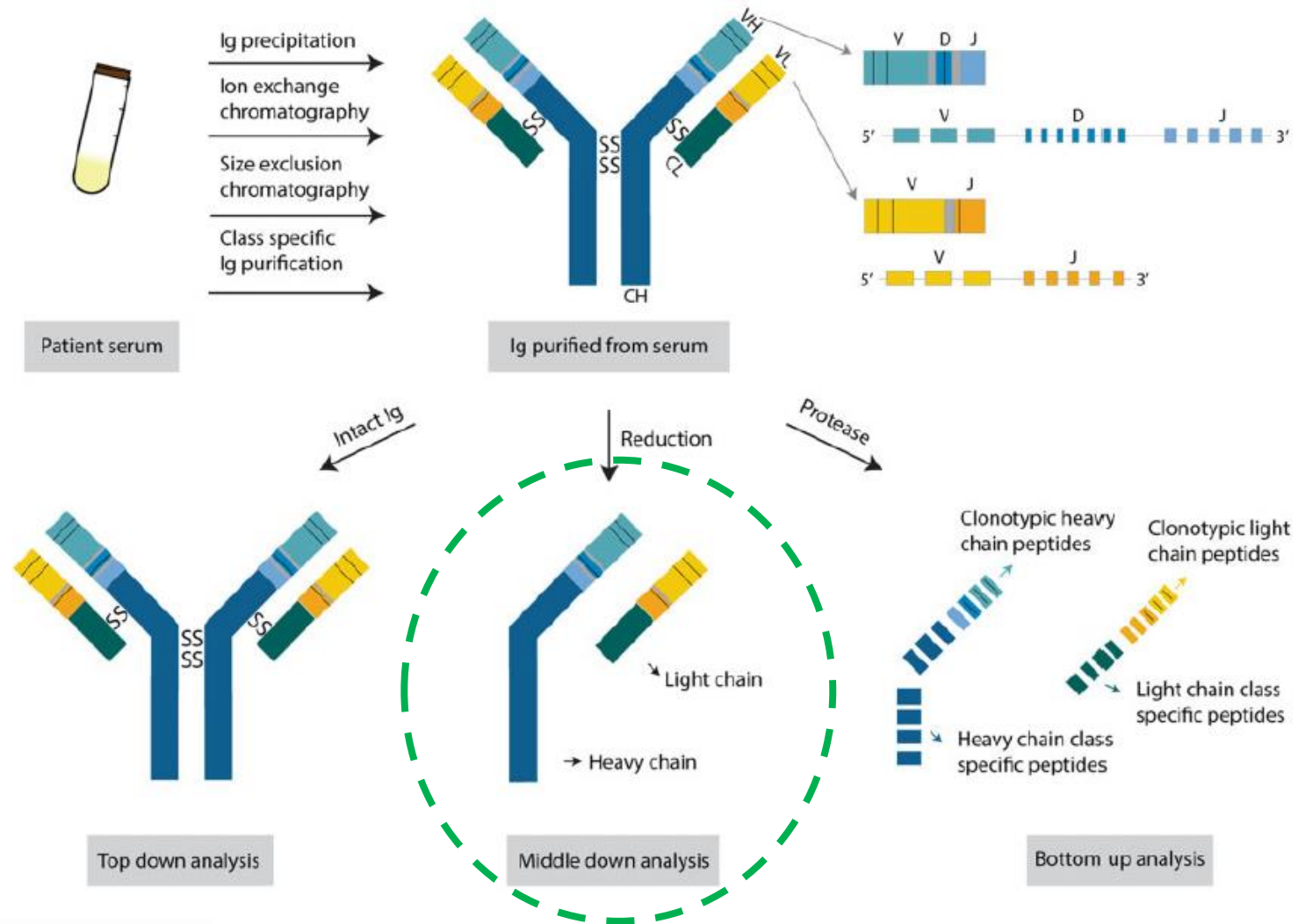
Etape 2 :

Recherche clonopeptides spécifiques par LC/MS-MS // quantification Standard interne (universel...)



- Expertise massiste nécessaire
- Deux clonopeptides / Ig
- Technique lourde - coût

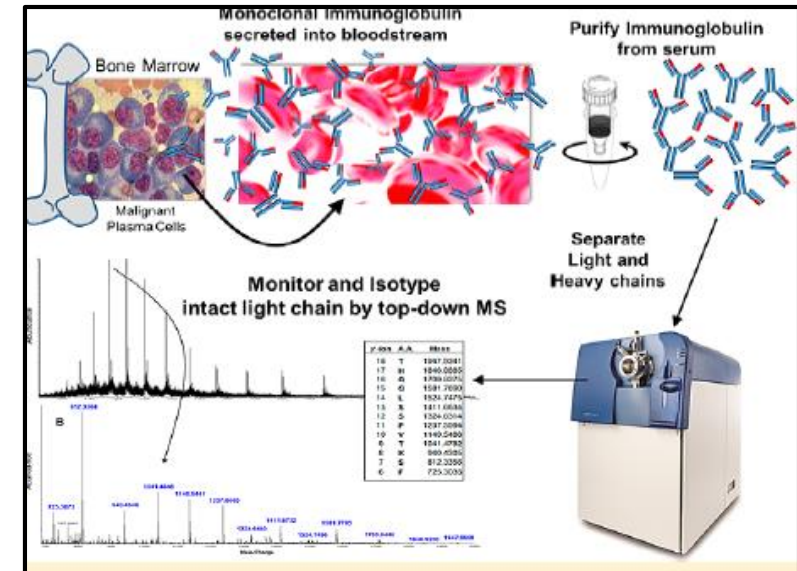
Mass spec : approches méthodologiques



Quelles stratégies analytiques en spectrométrie de masse middle-down ?

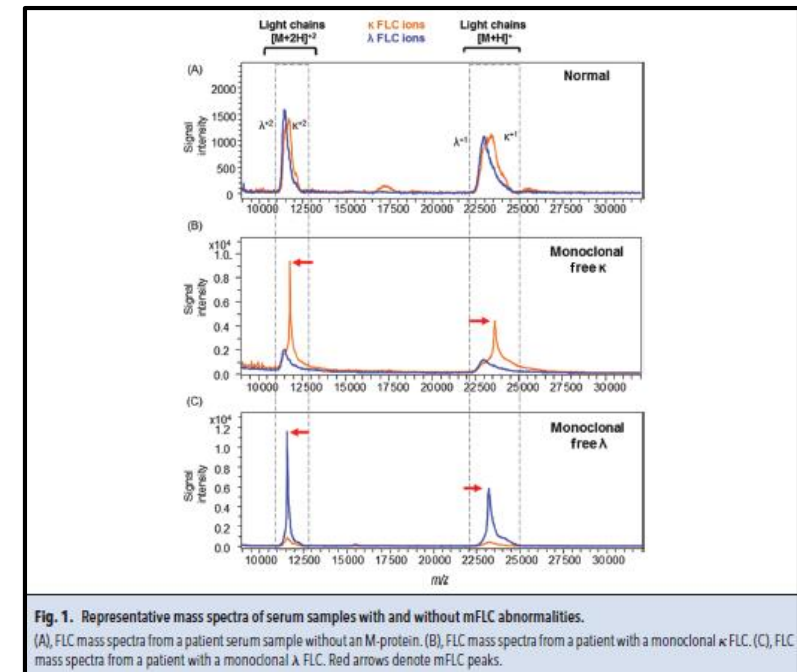
• LC-ESI-Q -TOF

- Chromatographie liquide puis MS Esi-Q-TOF
- miRAMM : première description 2014
- Isolement des Ig + réduction (LC et HC)
- Sensibilité +++
- Pas adaptée à la grande routine (25 minutes d'acquisition)
- Interprétation délicate

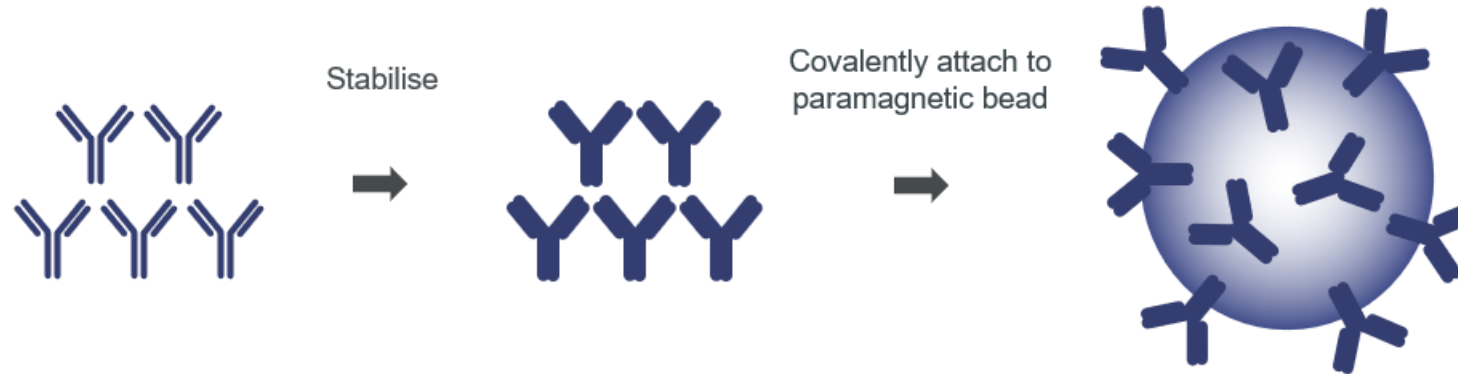


• MALDI -TOF

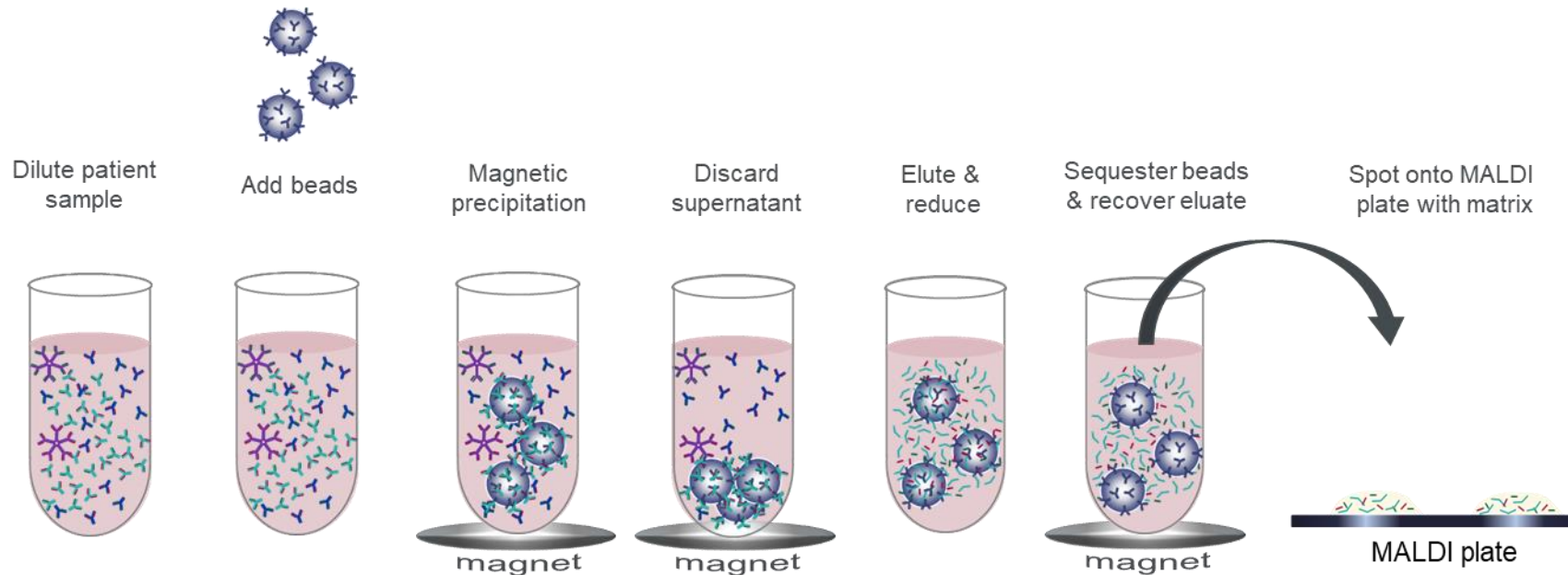
- Matrix-assisted laser desorption ionisation –time of flight
- Pas de chromatographie
- Isolement des Ig + réduction (LC et HC)
- Haut débit analytique <1 min
- 2015 : Mass Screen
- 2018 : Mayo Clinic : MassFIX en routine
- 2018 : TBS développe PTF Préparateur + MALDI = EXENT
interprétation accessible aux non massistes



Middle down analysis : pré-analytique (The Binding Site)



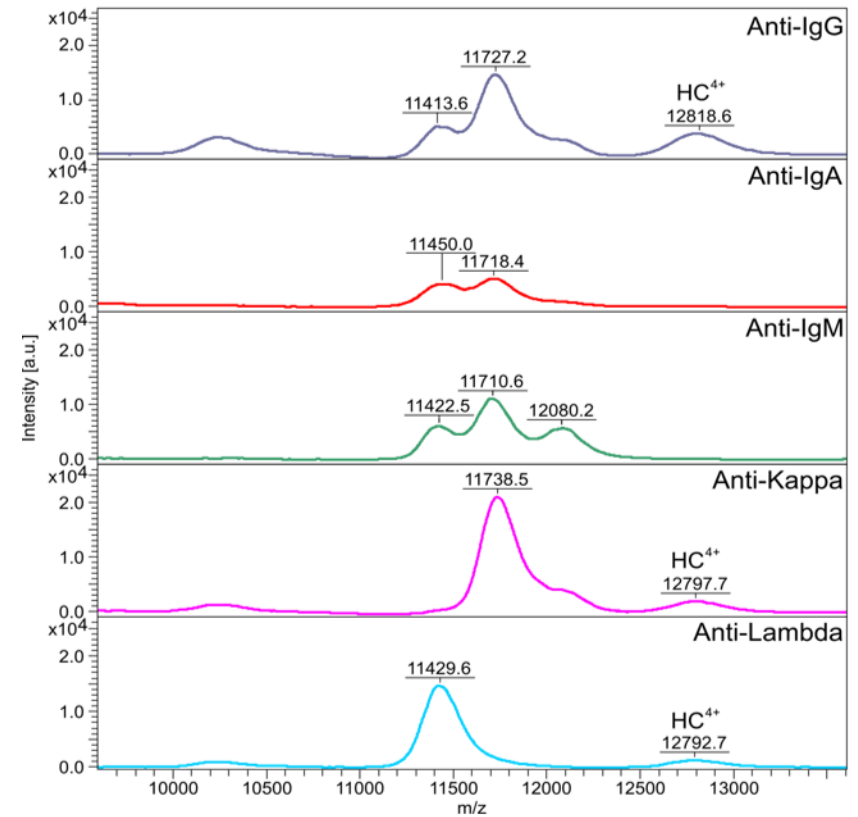
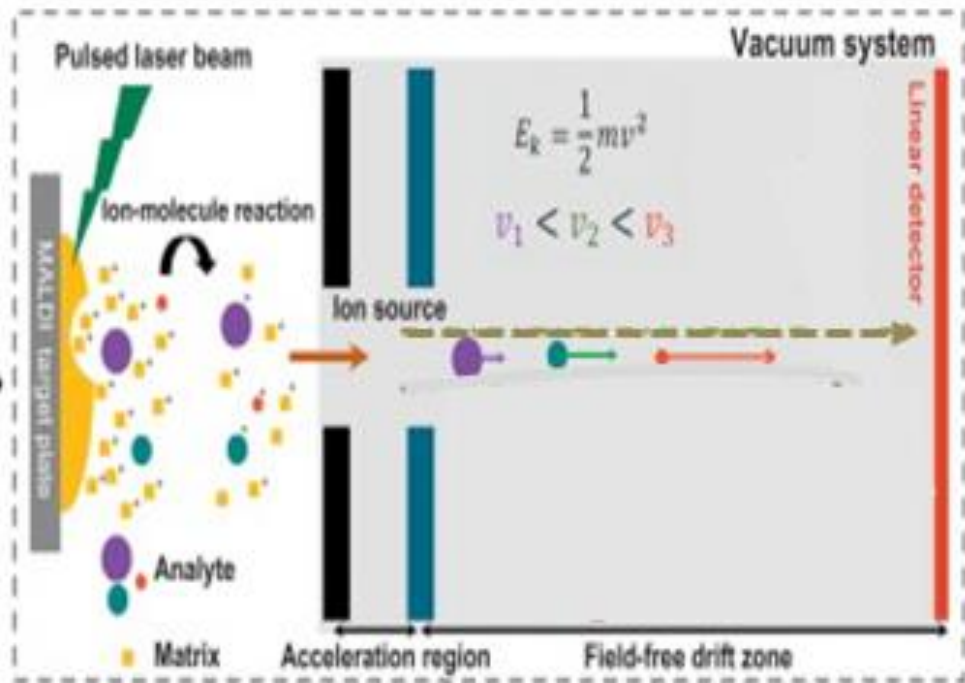
Billes magnétiques recouverte d'anticorps polyclonaux stabilisés : Prête à l'emploi



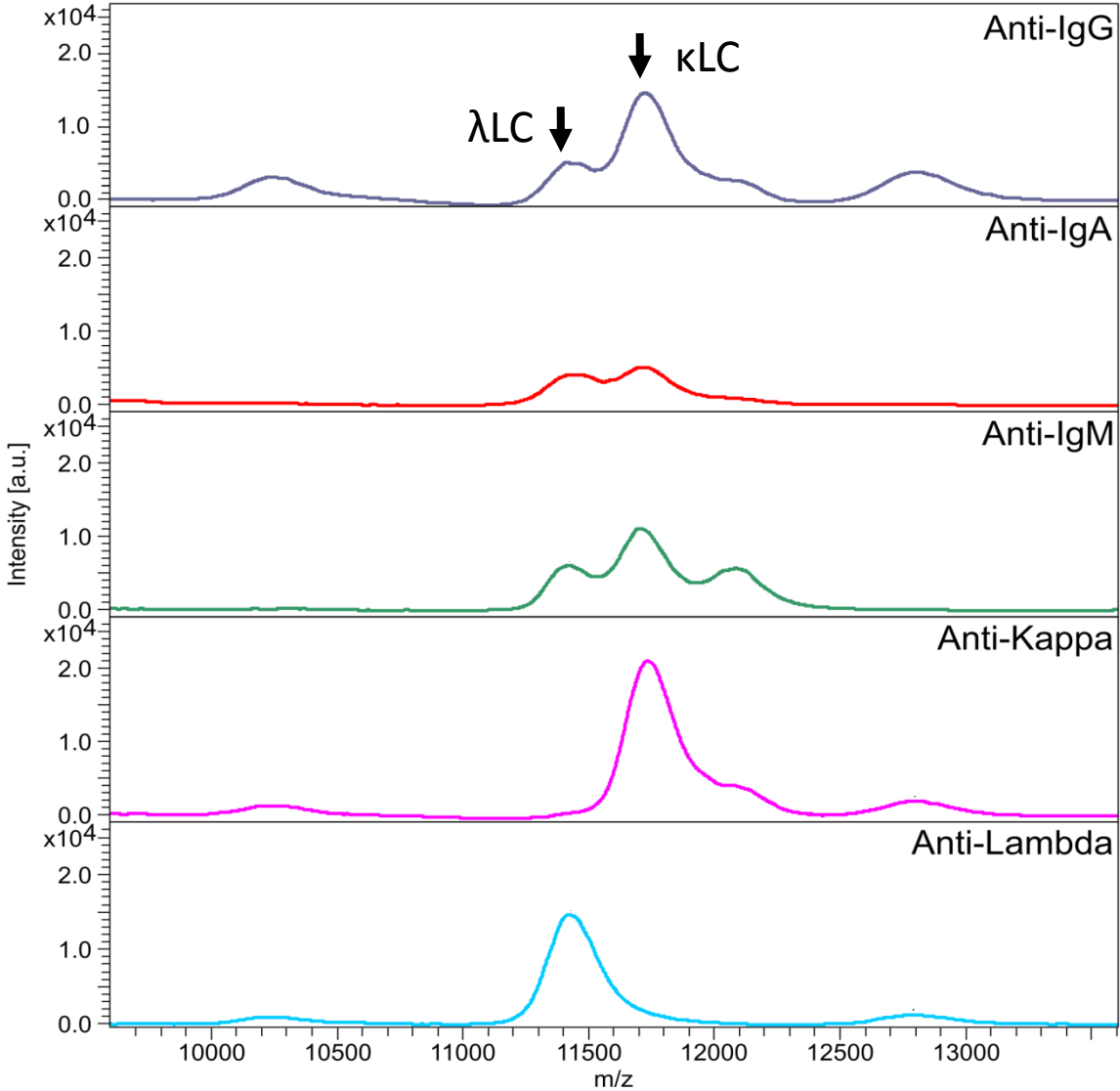
Middle down analysis : analytique MALDI-TOF (TBS)






Ionisation et separation des ions chargés

Acquisition et analyses des spectres m/z [10000-13000]

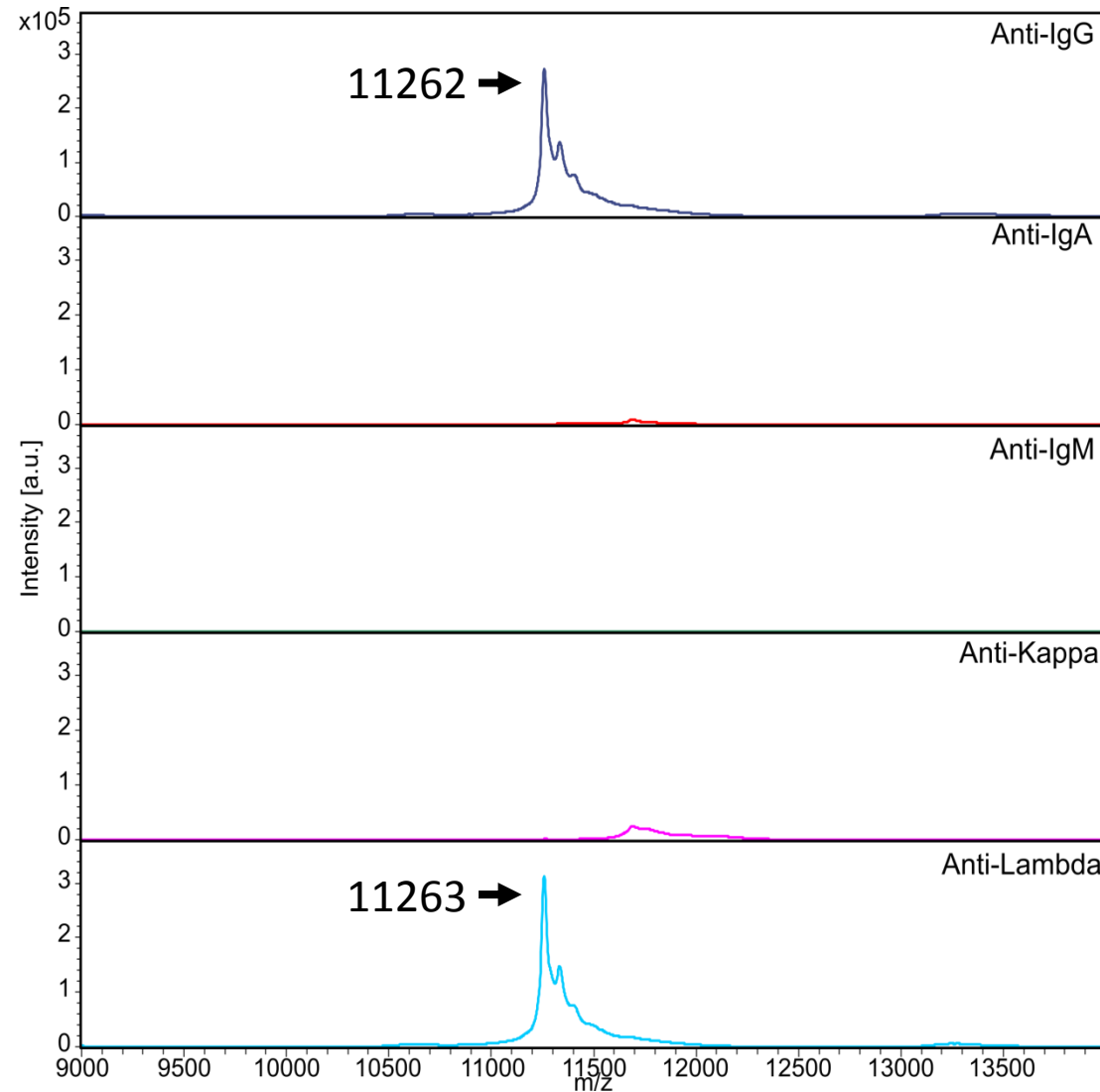


Serum normal



-  IgG
-  IgA
-  IgM
-  Kappa
-  Lambda

IgG lambda monoclonale



Binding Site : stratégie analytique 3 niveaux

GAMKL-MS

GAMKL+FLC-MS

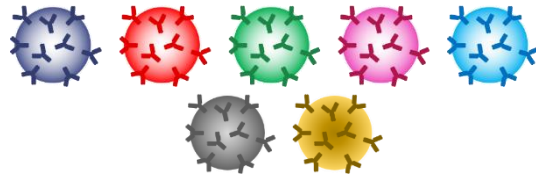
LC-MS

Sensibilité, TAT et coût

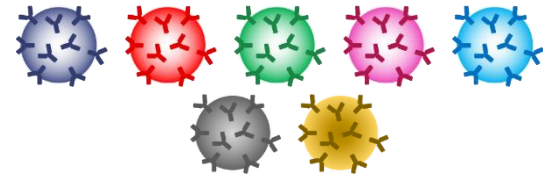
Anti-IgG/A/M/total κ /total λ



Anti-IgG/A/M/total κ /total λ / free κ / free λ

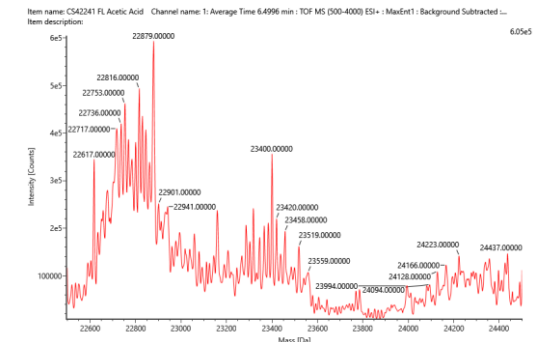
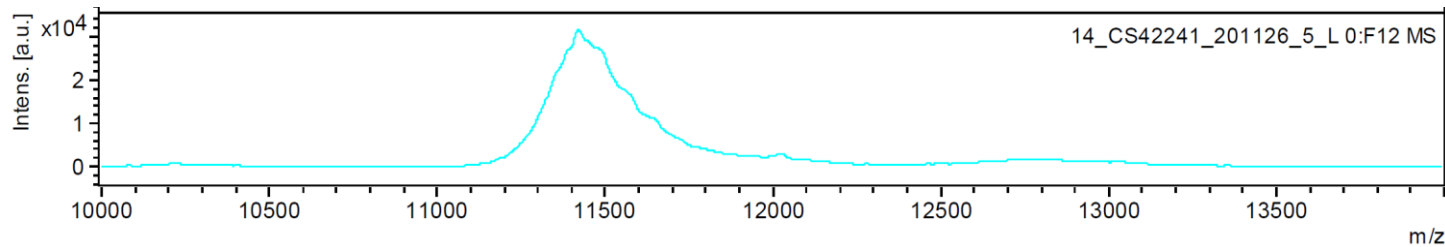


Anti-IgG/A/M/total κ /total λ / free κ / free λ



Chromatographie liquide

MALDI-TOF-MS

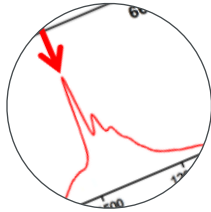


Plateforme MS : EXENT™



IMPORTANT NOTICE: the contents of this slide are strictly confidential and may contain proprietary and privileged information. This slide shall not be copied or disclosed, nor should any reliance be placed on its contents, without the express written consent of The Binding Site Group Limited

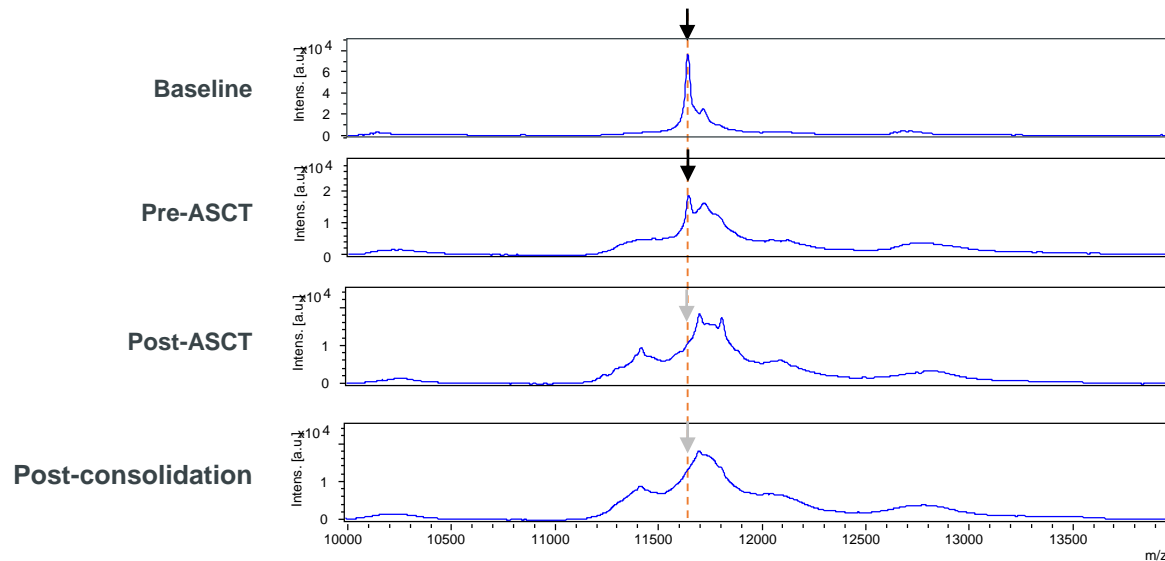
Intérêts de la MS : spécificité



Identification et typage de l'Ig monoclonale (IgG, IgA, IgM)

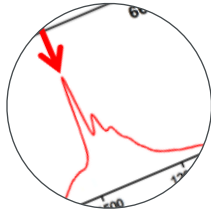
- Spécificité => Suivi
basée sur le M/Z

Intérêts de la MS : ↑ spécificité => Suivi de la réponse au traitement



SPE / IFE	Original Clone Present	
IgG kappa + free kappa	+	IgG kappa (m/z 11642)
Negative	+	IgG kappa (m/z 11643)
3 g/L	-	Query oligoclonal peaks?
negative	-	No detectable M-protein peaks

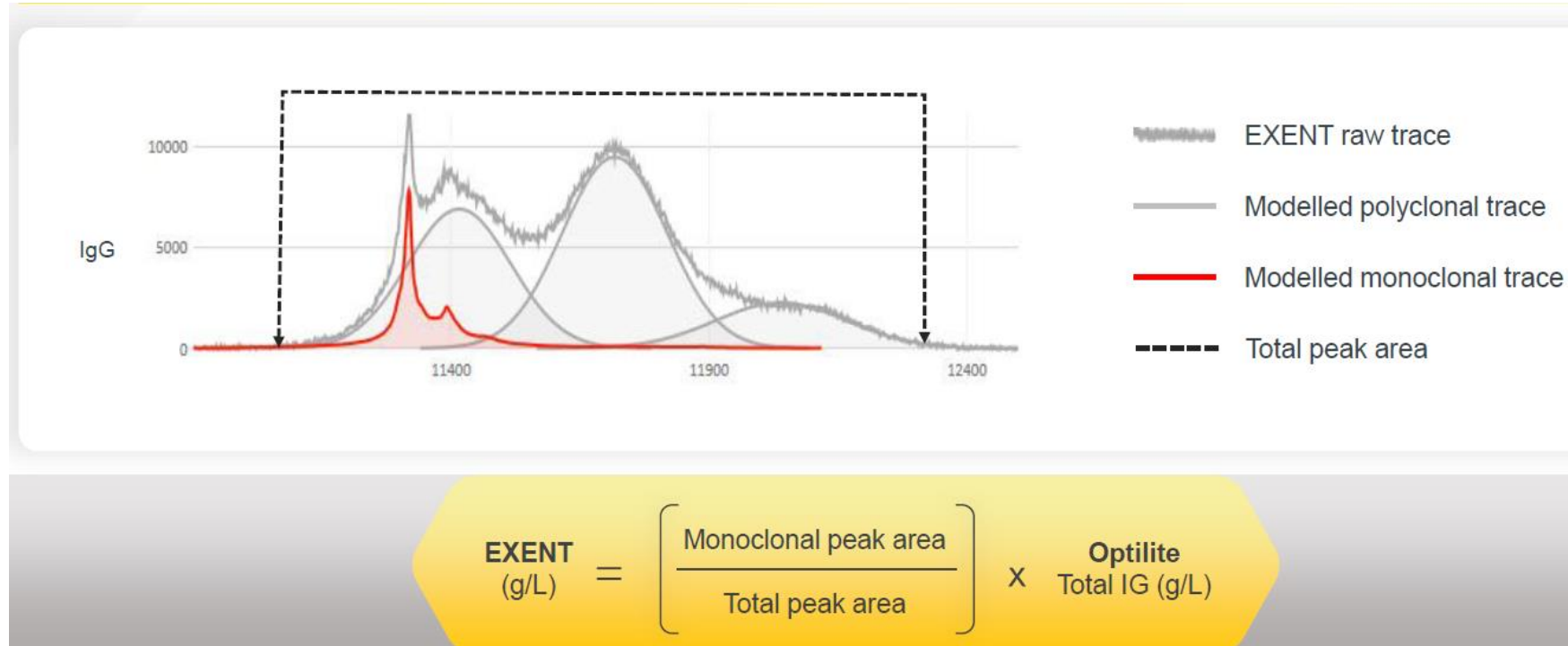
Intérêts de la MS : quantification



Identification et typage de l'Ig monoclonale (IgG, IgA, IgM)

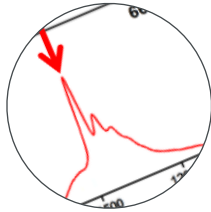
- Spécificité => Suivi
- **Quantification**
- Sensibilité accrue
 - VS SPEP and IF

Quantification relative/ dosage Ig correspondante



MALDI MS : LOQ - LOD fonction du fond polyclonal!!

Intérêts de la MS : sensibilité



Identification et typage de l'Ig monoclonale (IgG, IgA, IgM)

- Spécificité => Suivi
- Quantification
- **Sensibilité accrue**
 - VS SPEP and IF

Etude de prévalence :

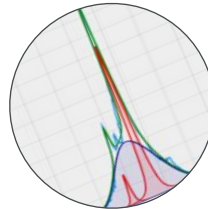
Population américaine à risque MGUS > 50 ans

Evaluation sensibilité gel vs Maldi

Prévalence MGUS

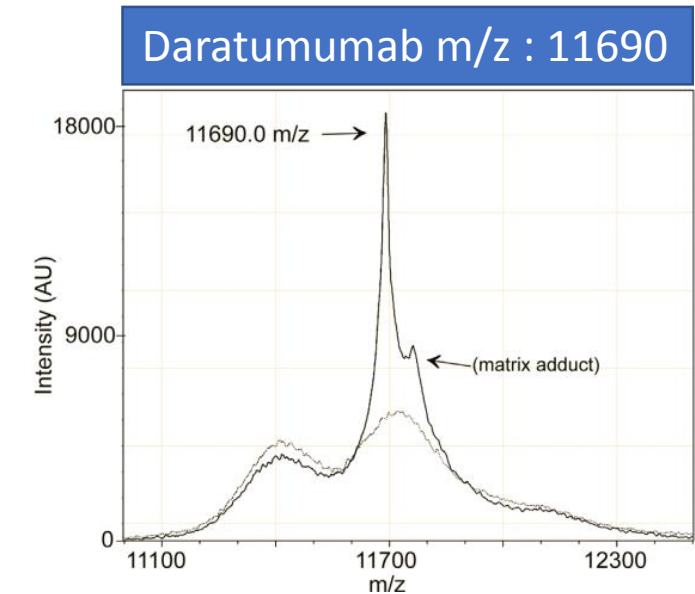
- **6% (101/1714) par Electro/IF**
- **13% (592/4207) par Maldi**

Impact système de soins?
Intérêt clinique à confirmer



Moins d'interférence avec les Ac monoclonaux thérapeutiques tmAb

- Différenciation tmAb vs M protéine endogène
- Indépendant du type de tmAb

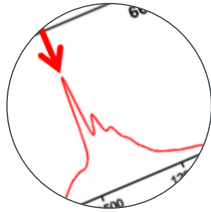


Etude rétrospective 31 patients traités par daratumumab

- 28/31 : distinction Protéine M vs Dara
- 3/31 : proximité entre les deux pics (<10 m/z) ne permet pas la distinction (co élution confirmée par Hydrashift)

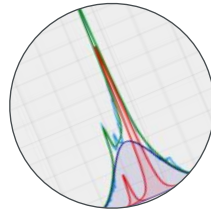
Moore et al CCA 2019

Intérêts de la MS : caractéristiques des Ig monoclonales



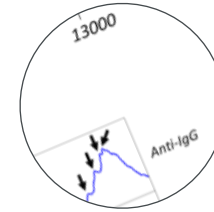
Identification et typage de l'Ig monoclonale (IgG, IgA, IgM)

- Spécificité => Suivi
- Quantification
- Sensibilité accrue
 - VS SPEP and IF



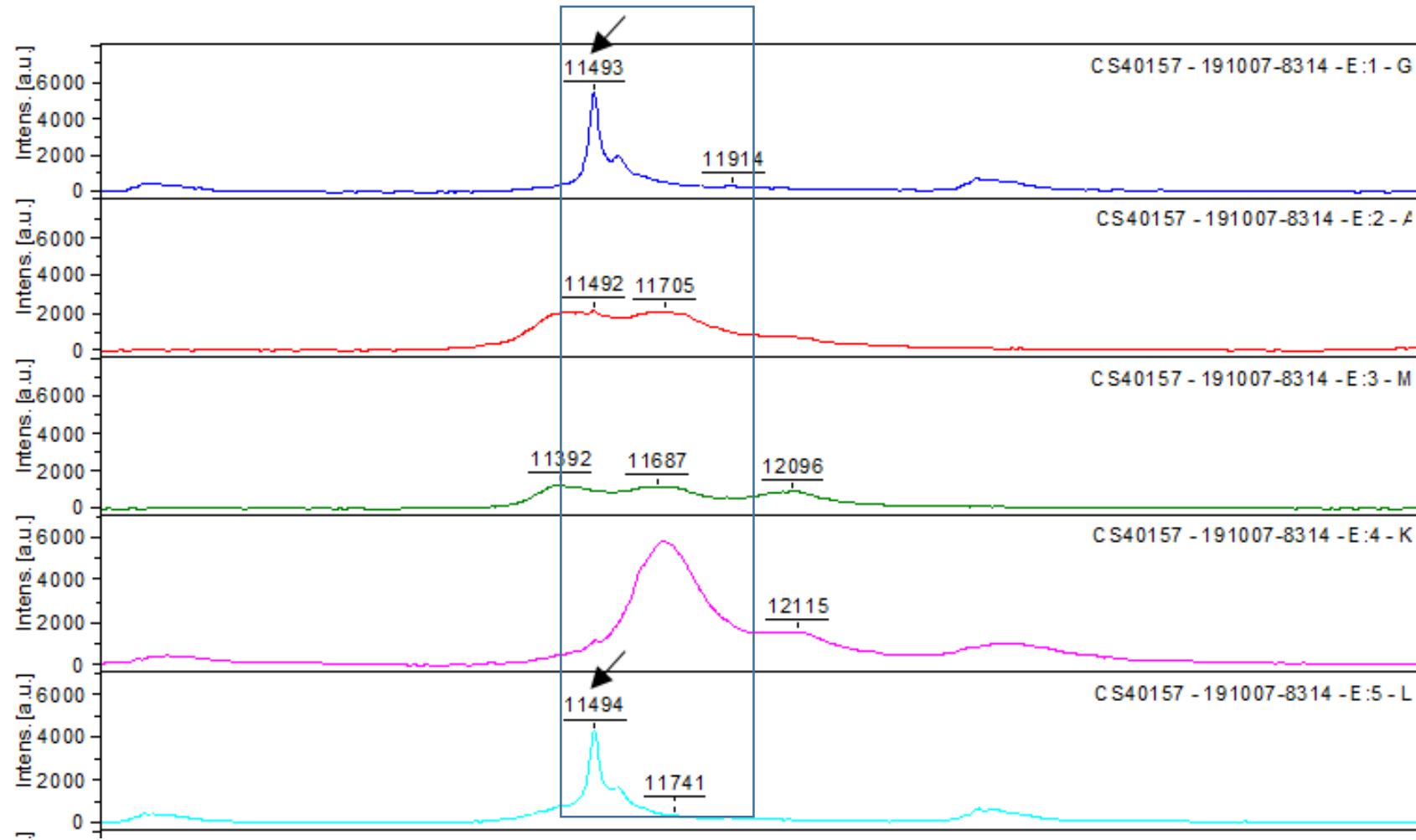
Moins d'interférence avec les Ac monoclonaux thérapeutiques

- Différenciation tmAb vs M protéine endogène
- Indépendant du type de tmAb

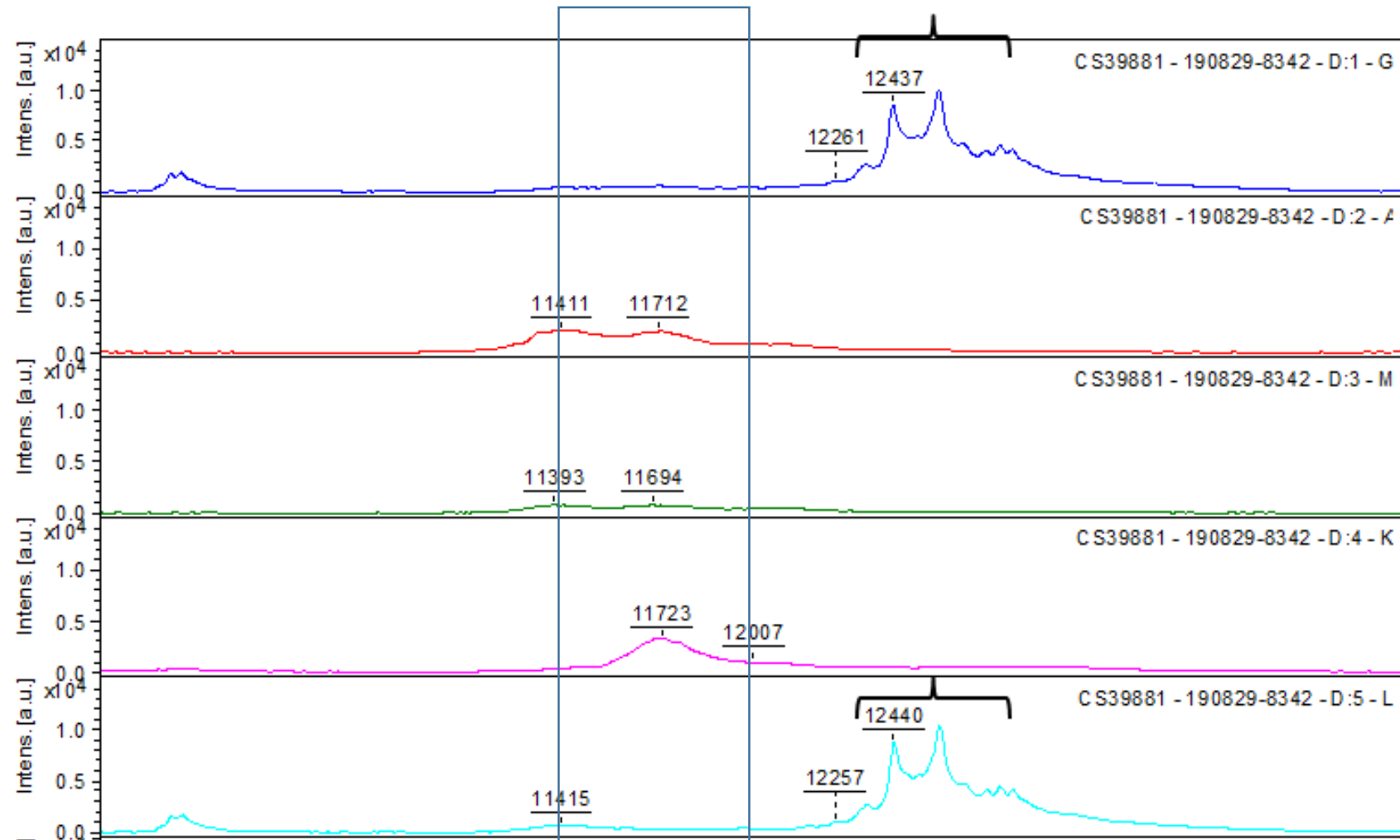


Mise en évidence de caractéristiques structurales particulières : glycosylations

IgG Lambda

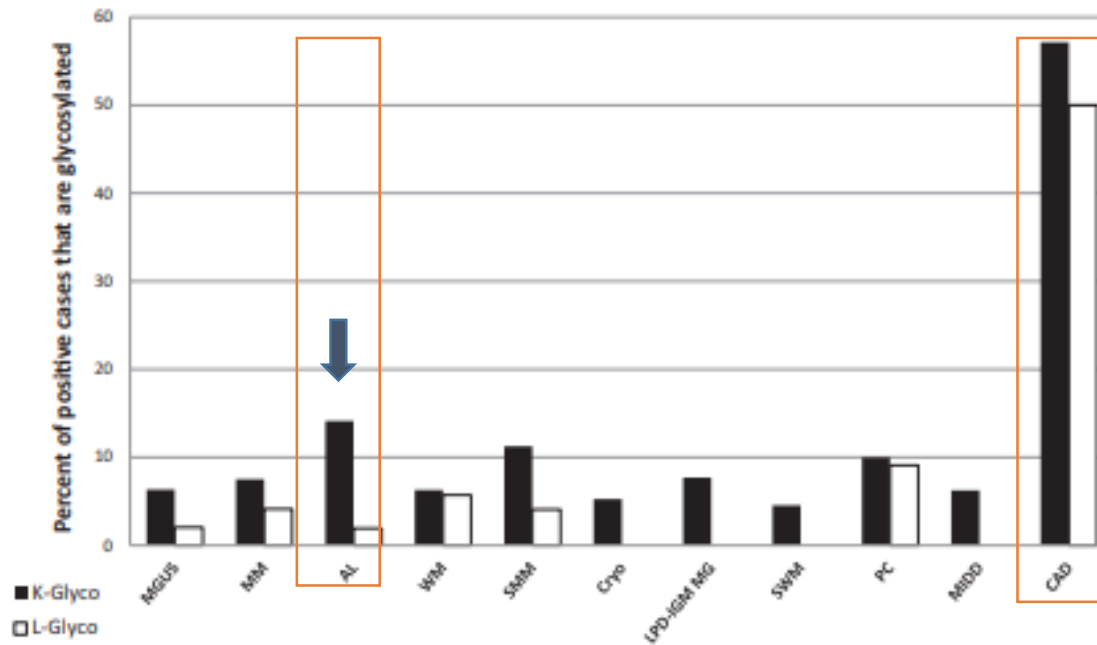


IgG Lambda N-glycosylée



Etude rétrospective mayoclinic 6315 patients suspects de gammopathie monoclonale

4118 anomalies monoclonales (Maldi positif)
N-glycosylation retrouvée chez 221 patients (5,4%)



	MGUS	MM	AL	WM	SMM	Cryo	LPD-IGM		SWM	PC	MIDD	CAD
K-No glyco	1151	628	79	134	71	18	12	21	9	15	6	
K-Glyco	78	51	13	9	9	1	1	1	1	1	8	
L-No Glyco	1005	371	254	33	47	10	16	4	10	4	1	
L-Glyco	21	16	5	2	2	0	0	0	1	0	1	

Fréquence par diagnostic de GM
Evènement rare <10% sauf :

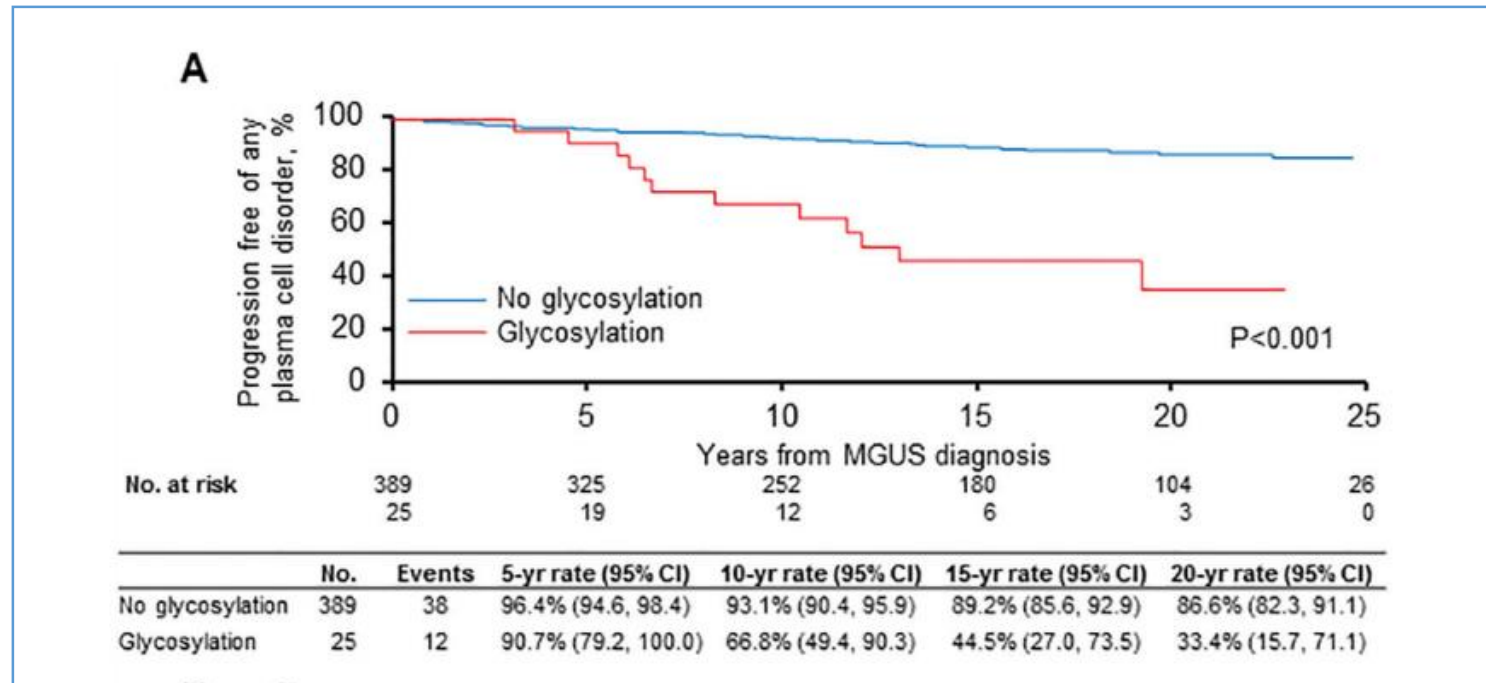
- Mie des Agglu. Froides (CAD) (>50%)
- Amylose AL (à chaînes kappa +++)

Fig. 4 Glycosylation status by diagnosis and light chain restriction. MGUS monoclonal gammopathy of undetermined significance, MM multiple

N-glycosylation of monoclonal light chains on routine MASS-FIX testing is a risk factor for MGUS progression

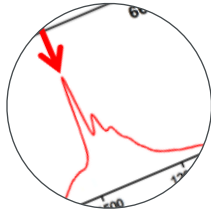
Angela Dispenzieri^{1,2}, D R Larson³, S V Rajkumar⁴, R A Kyle⁴, S K Kumar⁴, Taxiarchis Kourelis⁴, Bonnie Arendt⁵, Maria Willrcih⁵, Surendra Dasari³, David Murray⁵

- 414 patients MGUS
 - 25 patients avec N-glycosylation
 - Sur-risque de progression vers une dyscrasie plasmocytaire



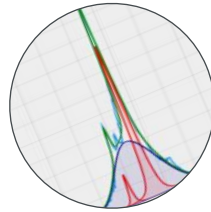
- Risque global de progression vers l'amylose AL => HR = 10,1 (95%-2,9-34,7)
- Surveillance particulière (NtProBNP, BGSA, protéinurie...) patients assimilés à des MGUS à haut risque évolutif

Intérêts de la MS : caractéristiques des Ig monoclonales



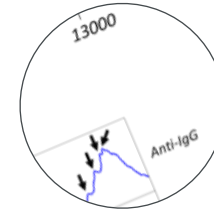
Identification et typage de l'Ig monoclonale (IgG, IgA, IgM)

- Spécificité => Suivi
- Quantification
- Sensibilité accrue
 - VS SPEP and IF



Moins d'interférence avec les Ac monoclonaux thérapeutiques

- Différenciation tmAb vs M protéine endogène
- Indépendant du type de tmAb



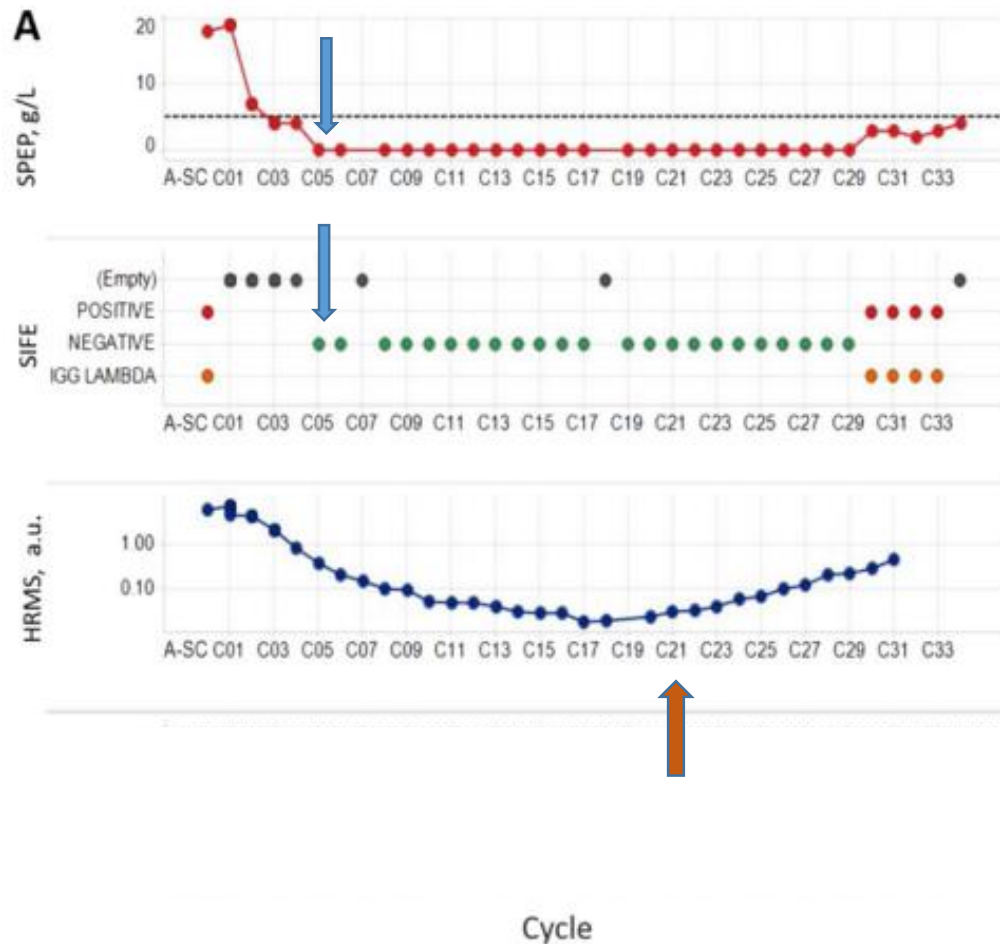
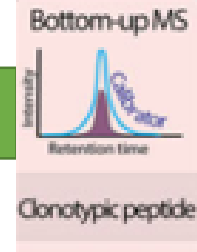
Mise en évidence de caractéristiques structurales particulières : glycosylations

Impact Clinique potentiel

Performances cliniques

Monitoring dynamique des réponses profondes **MALDI** vs **Clonopectide** : notion de MS -MRD

Maldi : monitoring d'une réponse profonde au delà de la réponse complète immunochimique



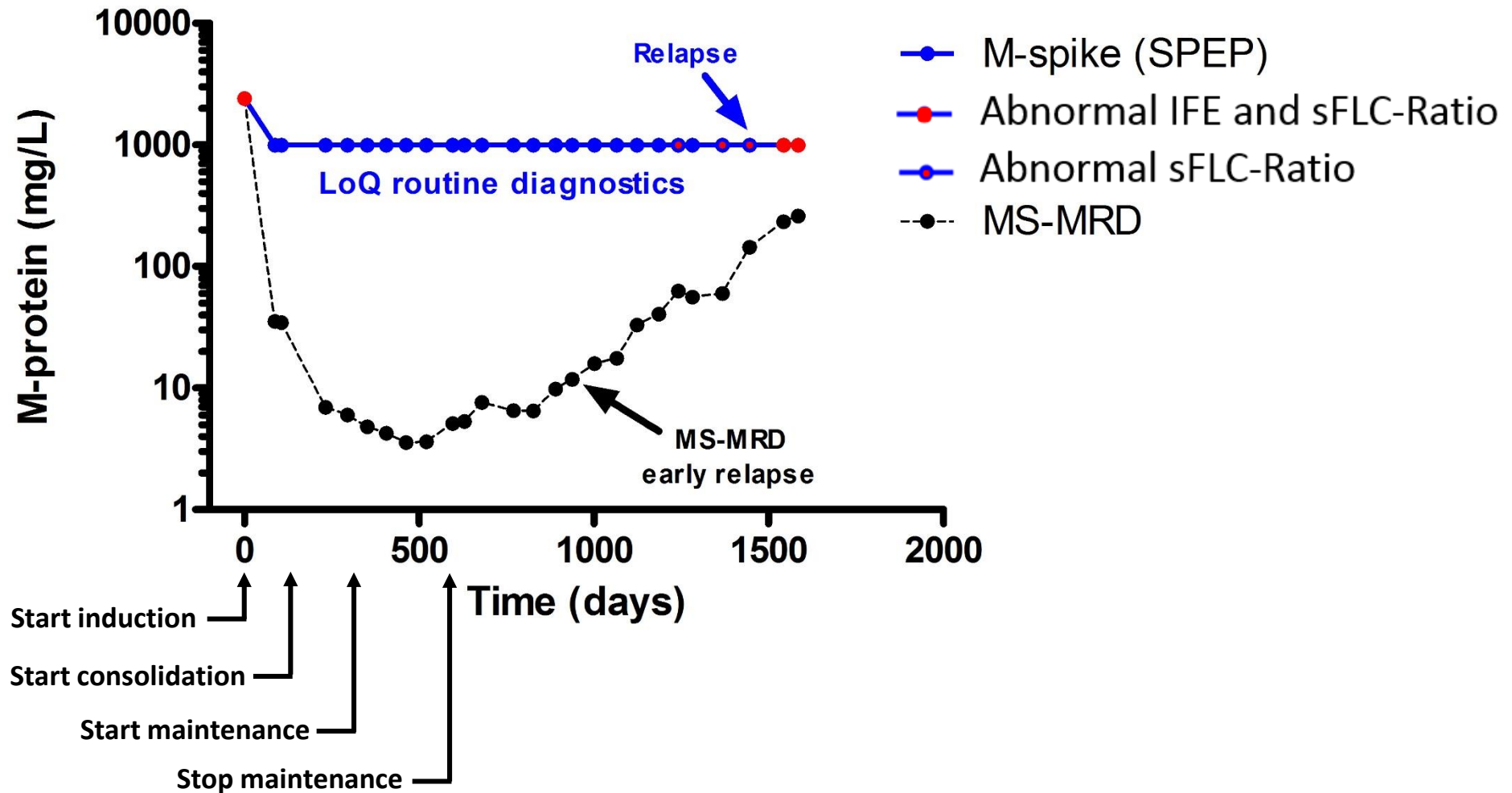
Maladie mesurable au diagnostic

C5 : EPS et IF négatives

MS positive à tous les cycles

Augmentation du signal confirmé dès C21 => Progression précoce

MS clonopeptides : monitoring dynamique de la réponse profonde

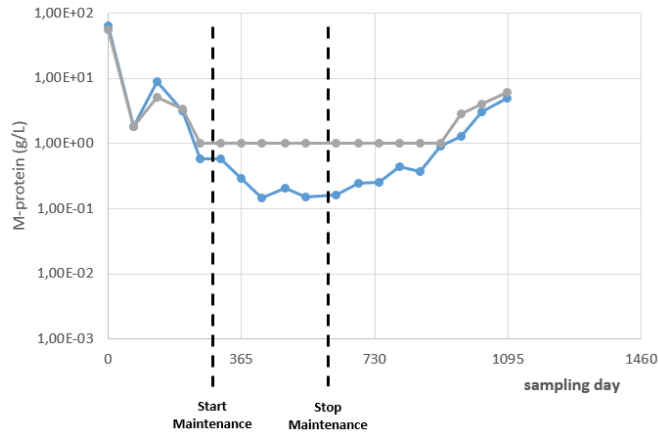


Unpublished data.

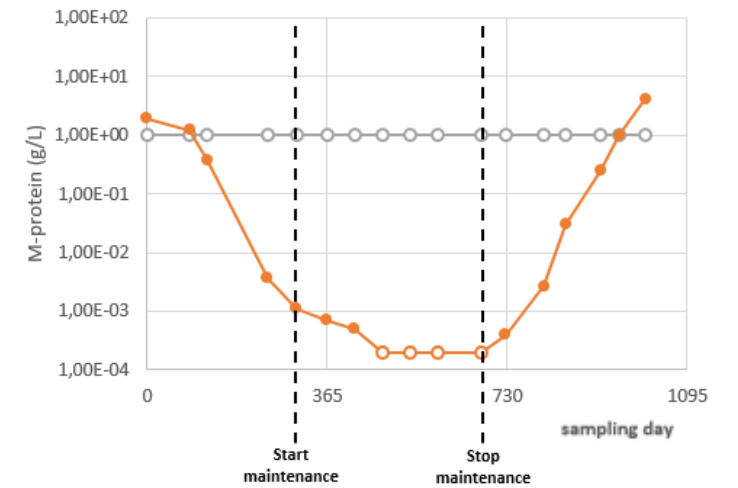
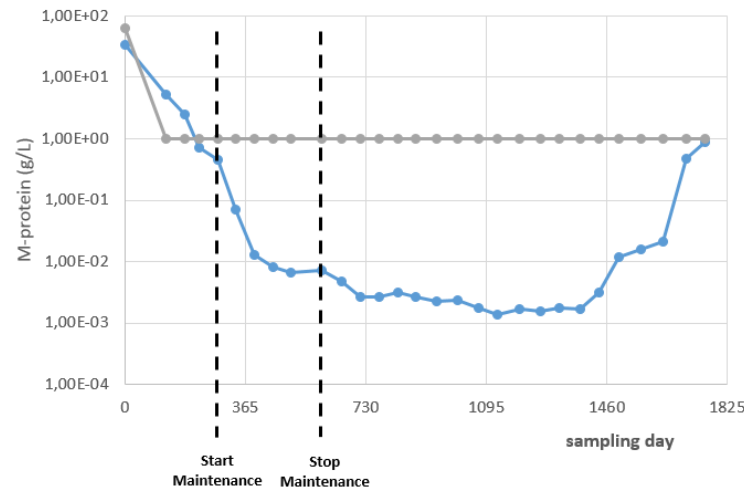
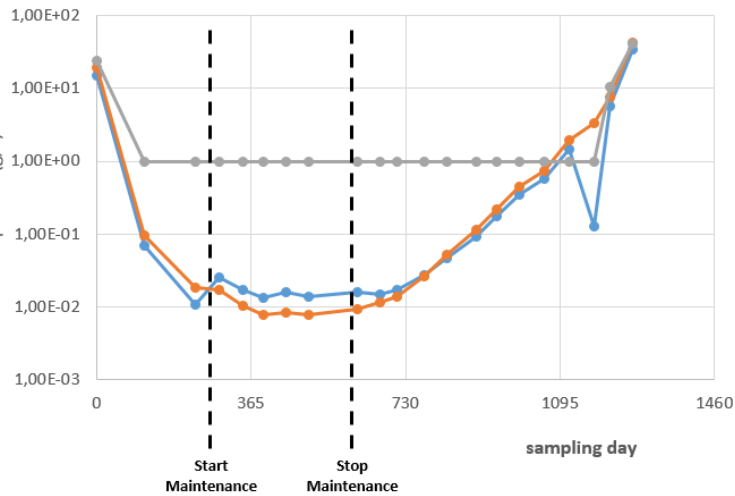
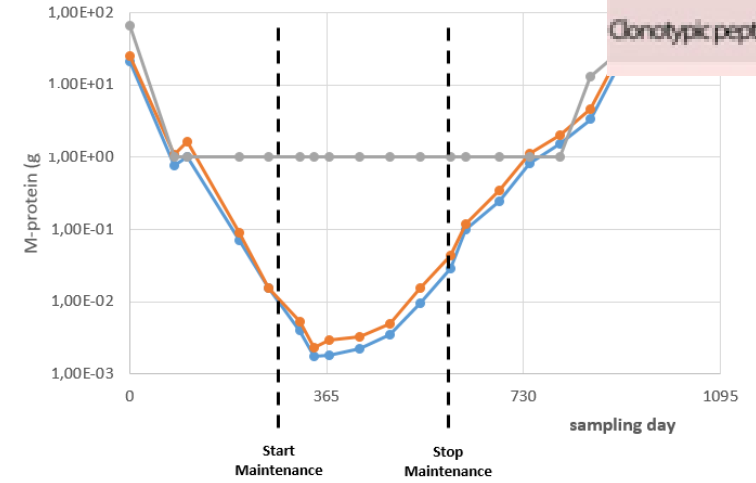
MS clonopeptides : exemples de monitoring dynamique de la réponse profonde



A) No deep response



B) Disease activity ↑ during maintenance therapy



C) Disease activity ↑ soon after stop maintenance therapy

D) Deep response

E) Deep response including MS-MRD neg samples (○)

Unpublished data.

Performances cliniques

Monitoring dynamique des réponses profondes **MALDI** vs **Clonopectide** : notion de MS - MRD

MS – MRD corrélation à la MRD médullaire ?

MS – MRD négative augmente la survie sans progression?

Approche clonotypique

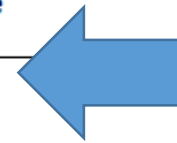
Concordance NGS MRD vs IF vs MS MRD – IFM 2009 – 42 patients

Comparaison en pré et post maintenance



Supplemental Table 2. Method comparison IFE and MS-MRD^a

	IFE positive	IFE inconclusive ^b	IFE negative
MS-MRD positive	64	3	39
MS-MRD negative	0	4	13



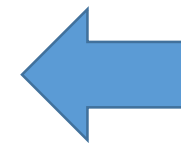
Gain de sensibilité

^aMS-MRD method without Ig-purification and without SIL.

^bIFE-result inconclusive because of oligoclonal pattern or high polyclonal Ig-background. IFE, immunofixation electrophoresis.

Table 2. Method comparison NGS-MRD and MS-MRD. ^a		
	NGS-MRD positive	NGS-MRD negative
MS-MRD positive	57	8
MS-MRD negative	9	7

^aMS-MRD method without Ig-purification and without stable isotope-labelled calibrators.

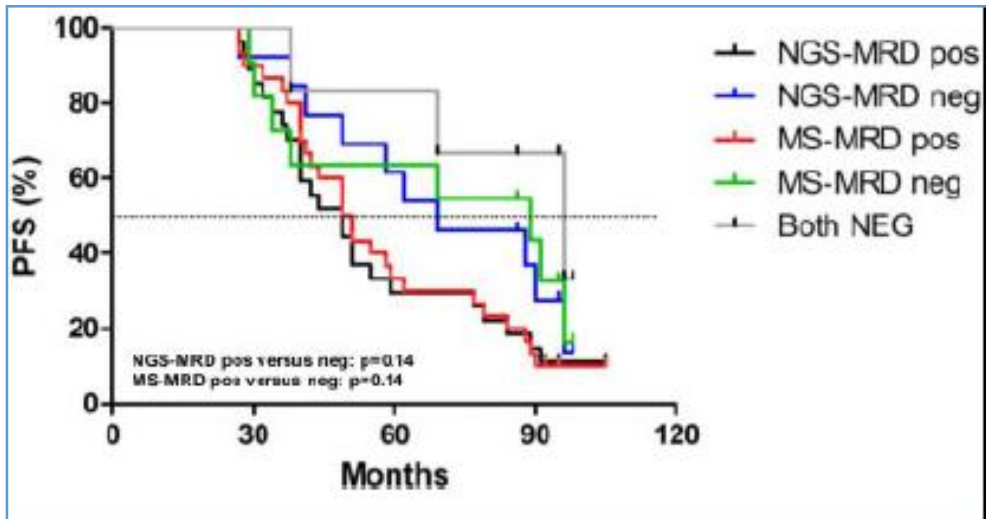


Concordance 80 %

Multiple Myeloma Minimal Residual Disease Detection: Targeted Mass Spectrometry in Blood vs Next-Generation Sequencing in Bone Marrow.

Langerhorst P, Noori S, Zajec M, De Rijke YB, Gloerich J, van Gool AJ, Caillon H, Joosten I, Luiders TM, Corre J, VanDuijn MM, Dejoie T, Jacobs JFM.

Clin Chem. 2021 Oct 13;hvac187. doi: 10.1093/clinchem/hvac187. Online ahead of print.



PFS la plus longue observée pour les doubles négatifs (NS faibles effectifs n=7)

Fig. 2. Kaplan-Meier curves for progression-free survival (PFS).

Pour 6 patients
 augmentation du signal de MS MRD entre
 pré et post Maintenance : péjoratif sur la
 PFS

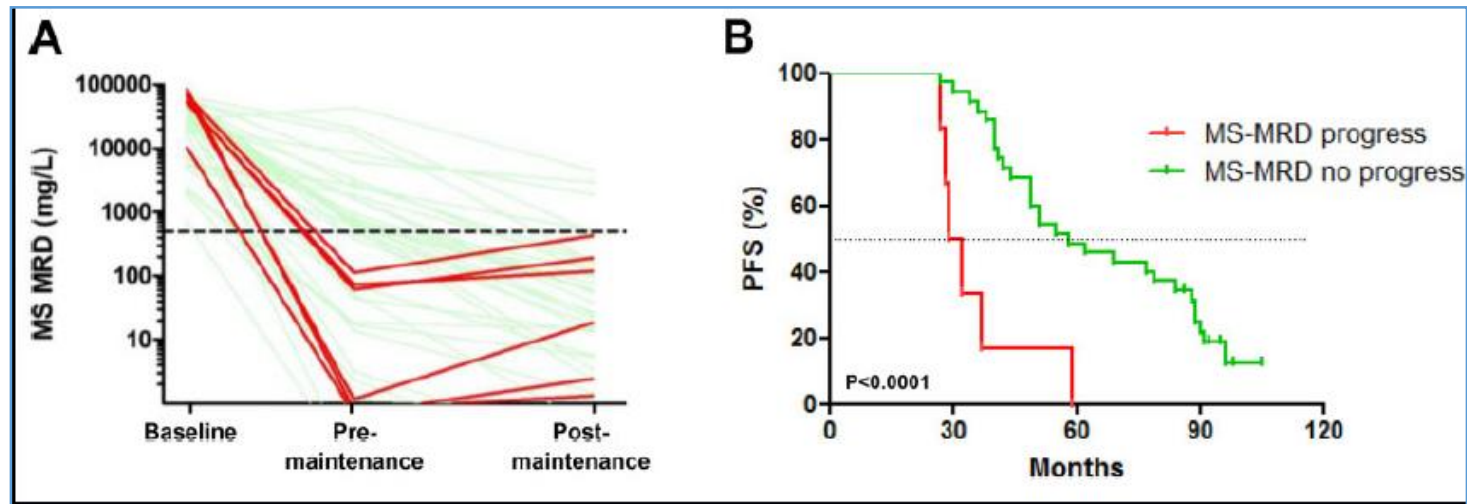
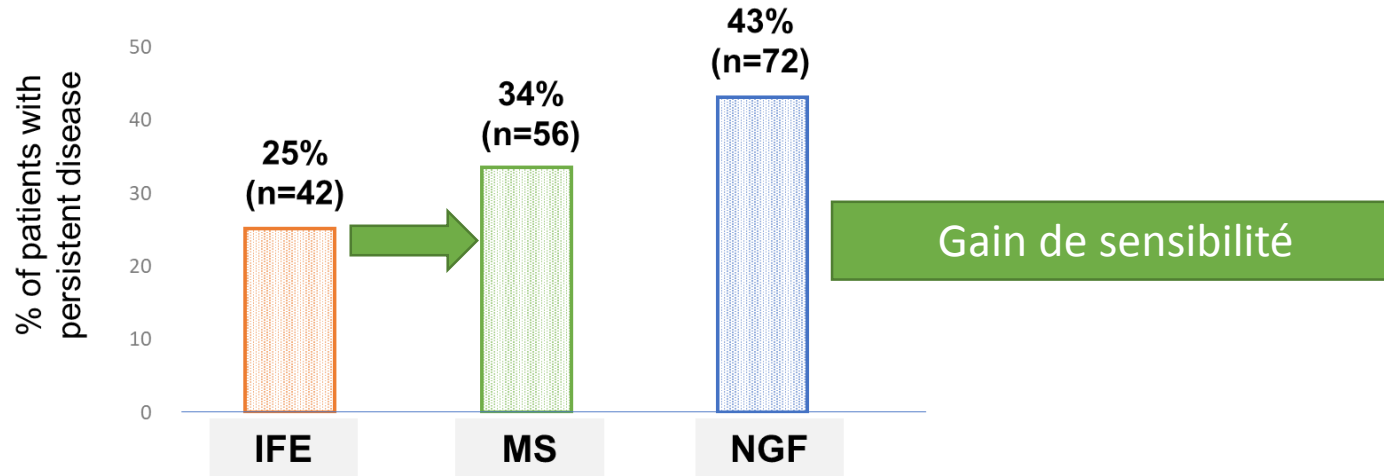
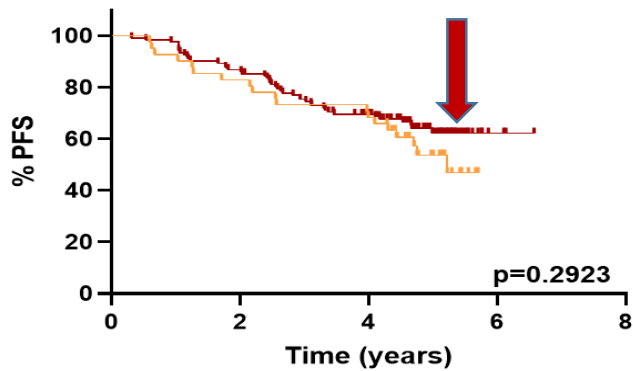


Fig. 3. MS-MRD monitoring.

MS Maldi : entre l'IF et le MRD médullaire NGF

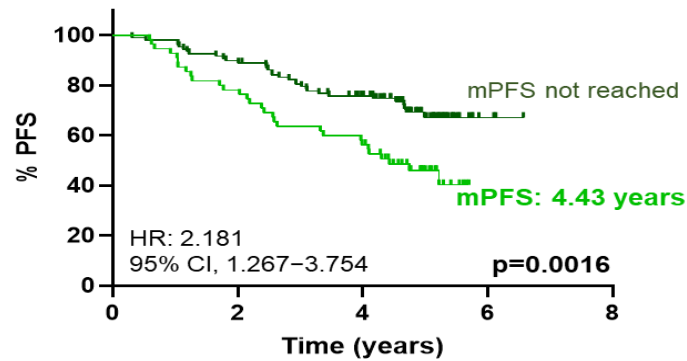


IFE



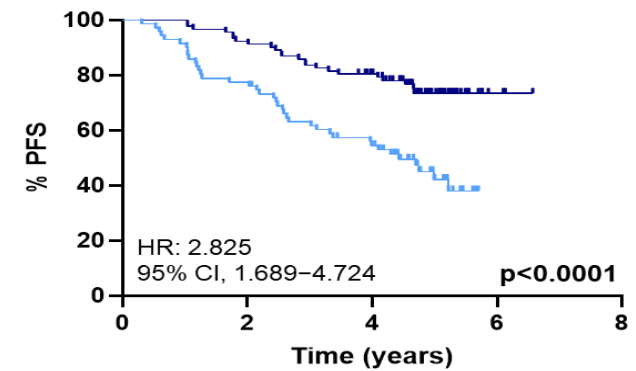
— IFE^{neg} — IFE^{pos}

MS



— MS^{neg} — MS^{pos}

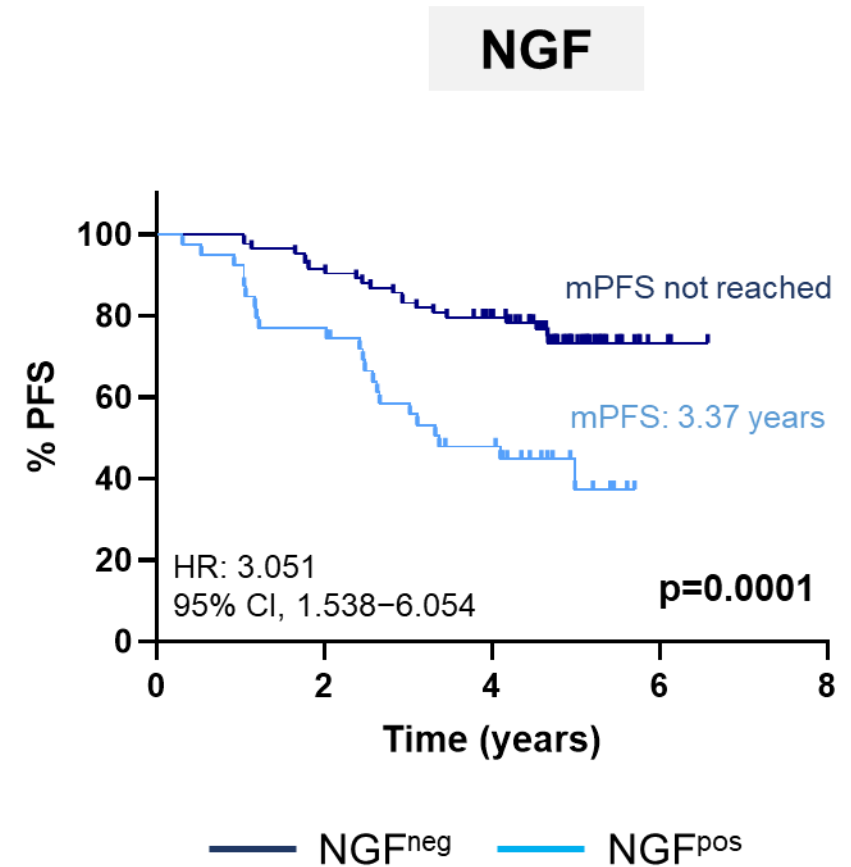
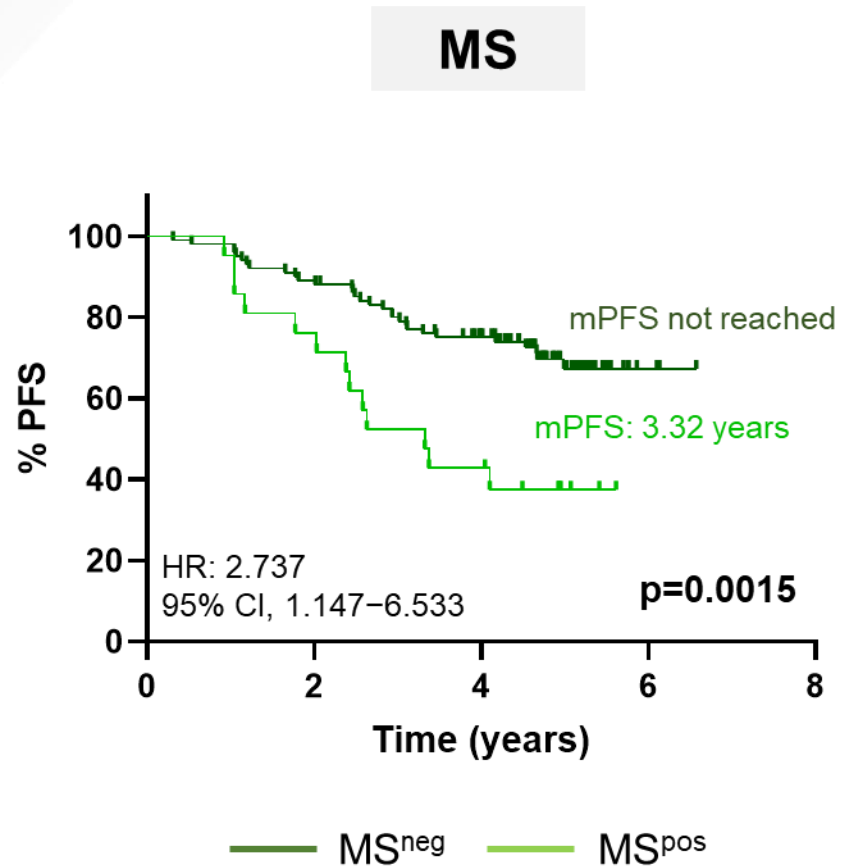
NGF



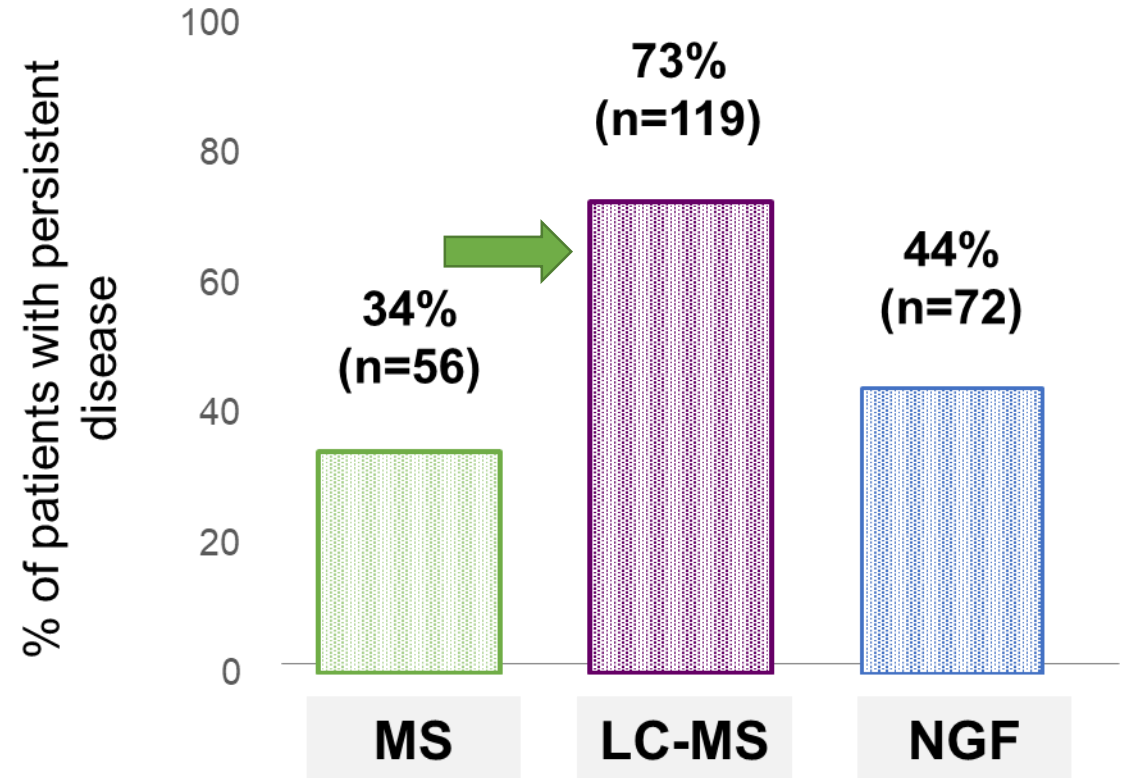
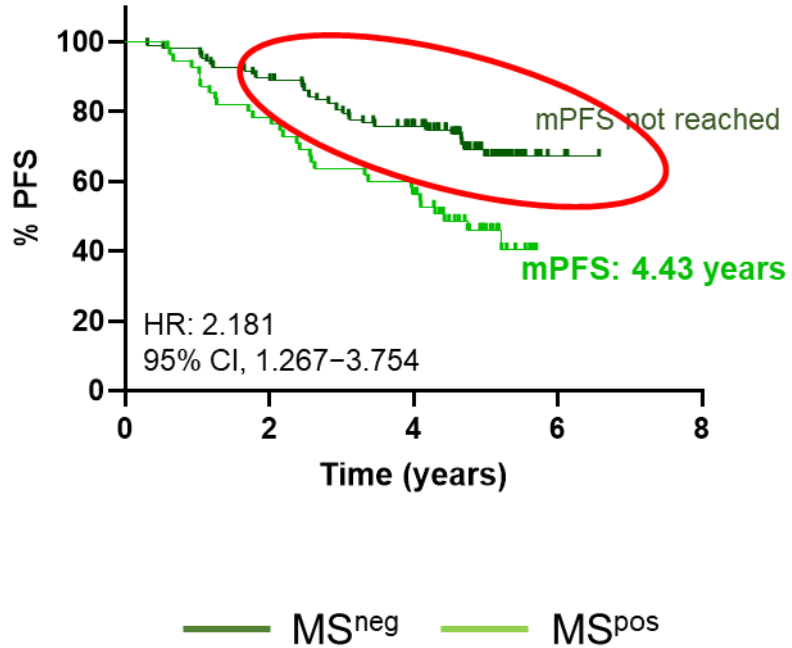
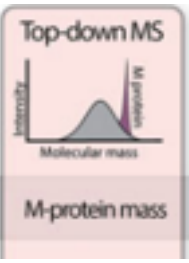
— NGF^{neg} — NGF^{pos}

MS MALDI survie sans progression des patients en réponse complète RC (IF negatives)

Comparaison MRD sanguine Maldi et MRD Médullaire NGF

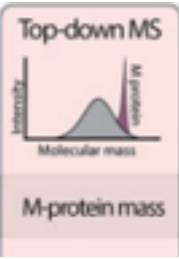


Traitement des MS MALDI négatives en LC-MS (test reflex TBS)



Gain de sensibilité entre MS et LC-MS 56 -> 119 : + 63

Maldi vs LC MS : évaluation réponse au traitement impact sur la survie sans progression



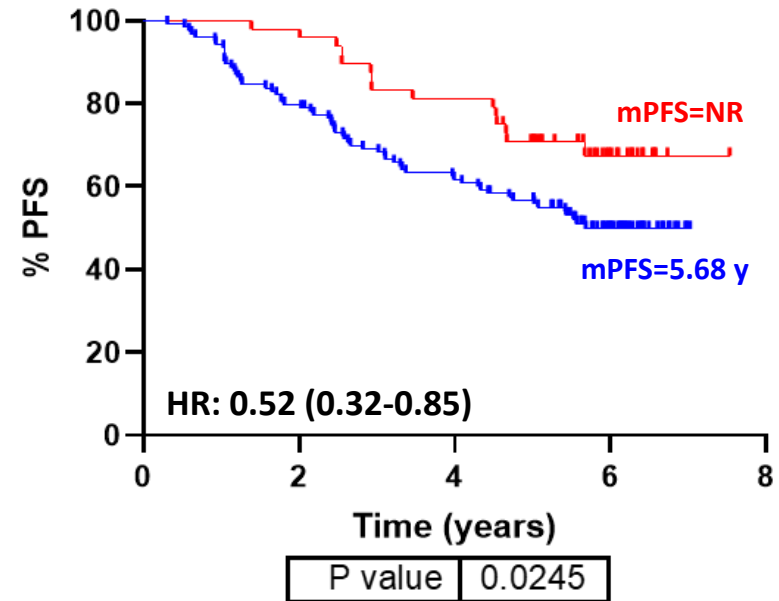
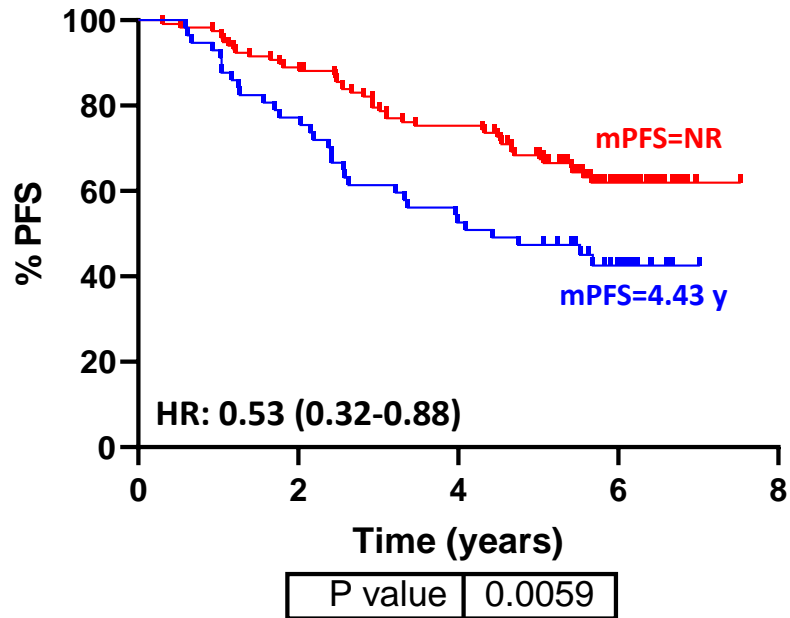
GAMKL-MS

vs

LC-MS

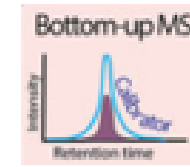
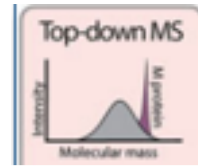
- GAMKL-MS pos (n=57)
- GAMKL-MS neg (n=118)

- LC-MS pos (n=123)
- LC-MS neg (n=52)



Augmentation de sensibilité ne se traduit pas par une amélioration de la survie sans progression : faux positif de la LC-MS?

Comparatif des deux techniques



	MS (TBS)	MS Clonopeptide
Milieu	Sang	Sang
Besoin échantillon diag	Oui	Oui
Besoin échantillon médullaire	non	Oui / Non si de novo sequencing
Faisabilité	Ok si sécrétion monoclonale suffisante	? de novo sequencing
Quantitative	Oui relative	Oui standard interne
Sensibilité	Dépend du fond polyclonal/ échantillon <100 mg/L	Dépend de l'automate <10 mg/L
Délai	Heures	Jours
Pré analytique	Automatisé	Complexe (expertise massiste)
Post analytique	Simple	Complexe (expertise massiste)
Coût	<100 euros	1 ^{er} point 2000 euros (si recours au RNAseq MO) puis 300 euros point suivant
Stratégie vs MRD médullaire	complémentaire	substitution
Stratégie commerciale	Remplacement des techniques conventionnelles immunochimiques Automate marqué CE	?
Cible	Laboratoires CH CHU	?

Quand évaluer la réponse profonde au traitement par MS?

- Guider la thérapeutique :
 - MS –MRD point décisionnel?
 - A 6 mois comme dans Midas : évaluation trop précoce!
- Valeur pronostique sur la PFS
 - MS-MRD fin de traitement en deux points successifs?
 - Pos/pos vs Pos/neg ou Neg/Neg : corrélation à la PFS
 - MS-MRD soutenue sur 1 an?
- Valeur pronostique sur la PFS combinée au résultat de MRD médullaire
- Corrélation avec MRD médullaire est variable au cours d'une réponse au traitement

Besoin d'études supplémentaires sur de grandes cohortes

Recommandations du comité Mass spec, IMWG

LC Maldi-TOF utilisable à la place des techniques conventionnelles pour le diagnostic et le suivi des patients dans les essais cliniques ...conséquence taux de CR plus faibles sur les essais à venir limitant la comparabilité avec des essais évalués antérieurement.

Usage des techniques Mass Spec pour l'identification des Ac monoclonaux thérapeutiques

Evaluer toutes les techniques de Mass Spec sur la question de la MS-MRD Maldi vs LCMS/Clonotypes

Evaluer le bénéfice de la MRD médullaire déclenchée en fonction en cas de résultat de MS-MRD sanguine négative

Confirmer l'impact clinique des protéines monoclonales N Glycosylées

Pour demain?

- Encore beaucoup de questions
- Intérêts certains mais :
 - En soins courants : à définir
 - En recherche clinique : à préciser
 - MRD développée en 2010
En RC exclusivement!

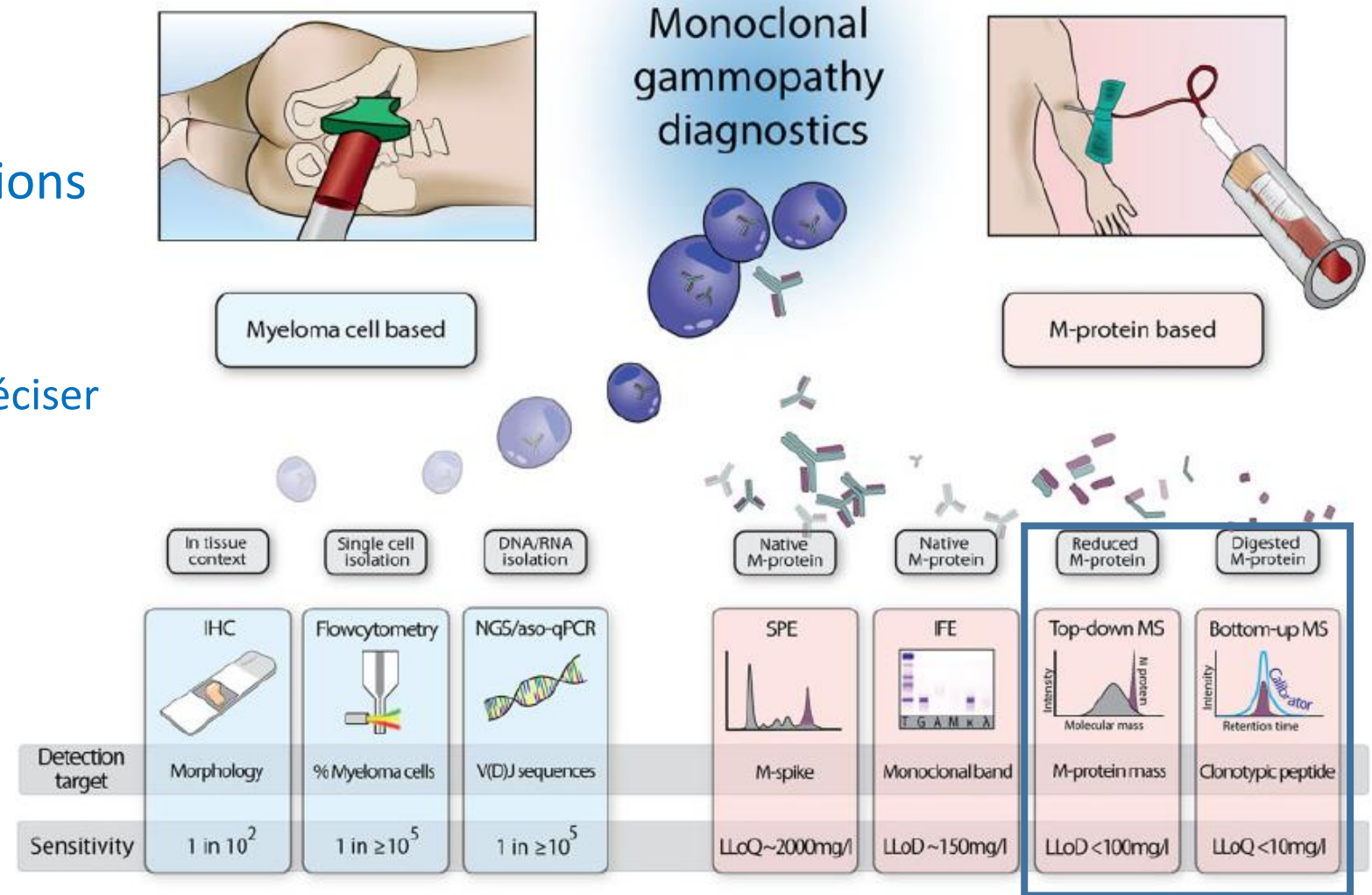


Fig. 1. Graphical overview of individual features of a selection of techniques to monitor MG disease activity. IHC, immunohistochemistry; LLoD, lower limit of detection; LLoQ, lower limit of quantification.

Merci pour votre attention

- Questions?

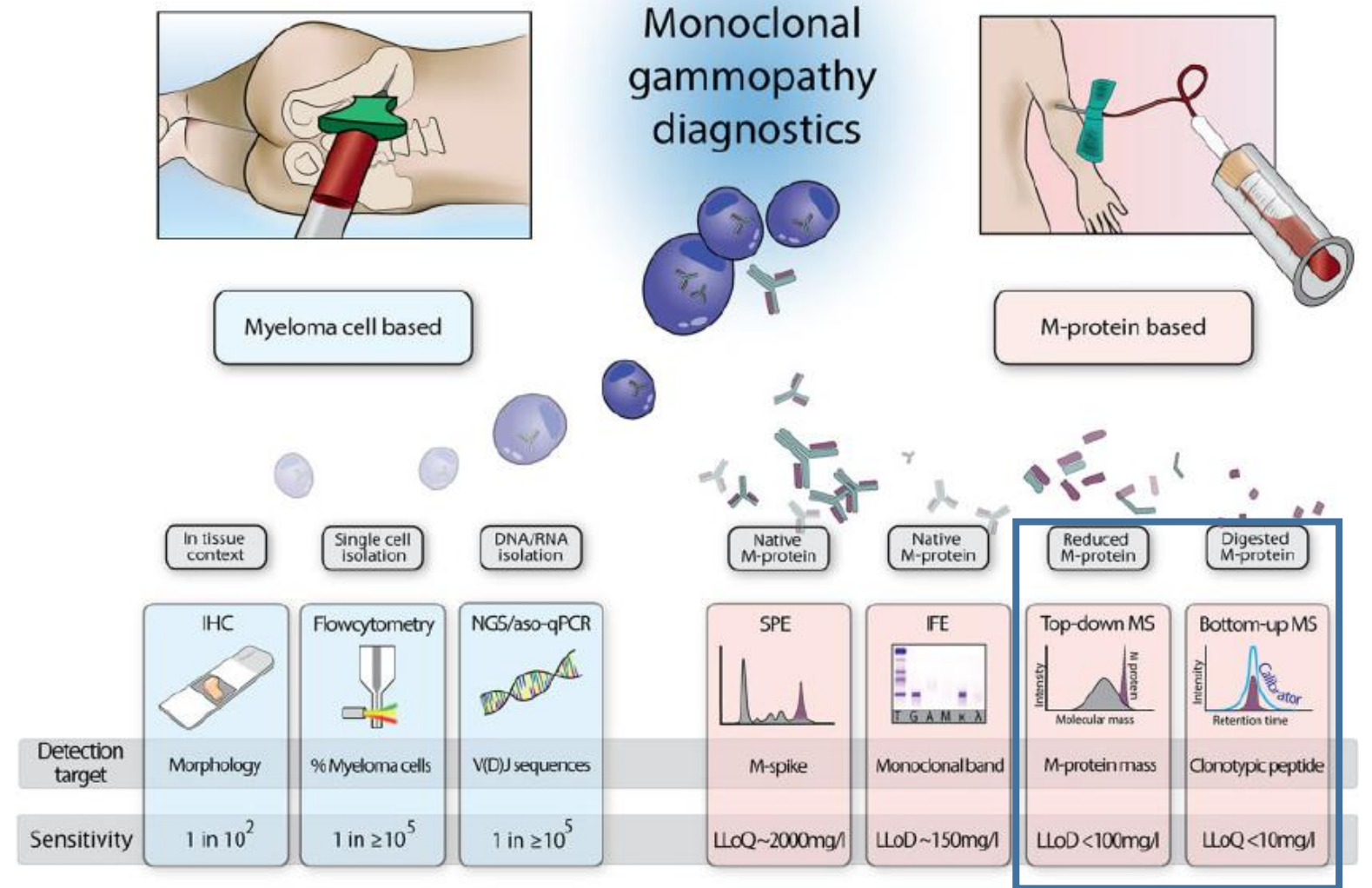


Fig. 1. Graphical overview of individual features of a selection of techniques to monitor MG disease activity. IHC, immunohistochemistry; LLoD, lower limit of detection; LLoQ, lower limit of quantification.