

Revue systématique

LA PCR DIGITALE EN GOUTTELETTES, UNE NOUVELLE APPROCHE DU SUIVI DE LA MALADIE RESIDUELLE DANS LA LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE.**DIGITAL DROPLET PCR, A NEW APPROACH IN MONITORING OF RESIDUAL DISEASE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA.**

Nachi Mourad (1), Kihel Ibtissem (1), Abed Amine (2) et Entasoltan Badra (3).

(1) Service de Biochimie, CHU Oran. Laboratoire de recherche de biochimie médicale et de biologie moléculaire (LBMBM). Université Oran1 Ahmed Ben Bella, Faculté de Médecine.

(2) Service de Biochimie, EHU Oran. Université Oran1 Ahmed Ben Bella, Faculté de Médecine.

(3) Service d'hématologie, EHU Oran. Laboratoire de recherche de biochimie médicale et de biologie moléculaire (LBMBM). Université Oran1 Ahmed Ben Bella, Faculté de Médecine

Résumé.

Dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) la rémission sans traitement (RST, en Anglais treatment-free survival « TFR ») par l'arrêt des inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) chez les patients qui ont atteint une réponse moléculaire profonde (RMP) est l'un des principaux objectifs à atteindre dans la stratégie thérapeutique actuelle. La surveillance des transcrits de fusion BCR-ABL1 se fait habituellement par une technique standardisée, la RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel (RT-qPCR ou QPCR), mais elle ne semble pas optimale dans la surveillance de la maladie résiduelle en raison de sa limite inférieure de détection (LoD) et de quantification (LoQ). Des données récentes suggèrent que la PCR numérique ou digitale (dPCR) est plus sensible et précise que la QPCR et qui peut représenter une méthode alternative idéale pour détecter une maladie résiduelle minimale (MRM). Cette revue de synthèse, a pour objectif de décrire le concept de la dPCR en gouttelettes (ddPCR ou Digital Droplet PCR) et de faire le point sur son utilisation potentielle dans le suivi de la MRM dans la LMC en particulier dans les stratégies d'arrêt du traitement par les ITK.

Mots clés : Leucémie myéloïde chronique (LMC), Transcrit BCR-ABL1, Maladie résiduelle minimale (MRM), Réponse sans traitement (RST), PCR en temps réel, PCR Digitale en gouttelette.

Abstract.

In chronic myeloid leukemia (CML) therapy one of desired objectives for patients who achieved a deep molecular response (RMP) is to be in treatment-free remission (RST) by stopping tyrosine kinase inhibitors (TKIs).

The Monitoring of BCR-ABL1 fusion transcripts is usually done by a standardized technique, real-time quantitative RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) (RT-qPCR or QPCR), but it does not appear to be optimal for monitoring of the residual disease because of its lower limits of detection (LoD) and quantification (LoQ). Recent data suggests that digital PCR (dPCR) offers more sensitivity and precision than QPCR, which may represent an ideal alternative for the detection of minimal residual disease (MRD). The aims of this review is to describe the concept of droplet dPCR (ddPCR or Digital Droplet PCR) and to evaluate its potential application in the monitoring of MRM in CML, particularly in the strategies of stopping treatment with TKI.

Key words: Chronic myeloid leukemia (CML), BCR-ABL1 transcript, Minimal residual disease (MRD), Treatment-free survival (TFR), Real-time PCR, Digital Droplet PCR

Auteur principal : NACHI Mourad

nachi.mourad@iniv-oran.dz

1. Introduction

La LMC est une hémopathie myéloproliférative maligne qui touche la cellule souche hématopoïétique(1). Son incidence varie de 1 à 2 cas/100 000 habitants et représente environ 15% des cas de leucémie de l'adulte nouvellement diagnostiquée(2). Sur le plan cytogénétique la LMC est associée à une anomalie chromosomique qui résulte d'une translocation réciproque équilibrée t(9;22)(q34;q11.2), entre les bras longs des chromosomes 22 et 9, impliquant une fusion du gène murin d'Abelson (ABL1) du chromosome 9q34 avec le gène Breakpoint Cluster Région (point de rupture de la

région cluster) (BCR) sur le chromosome 22q11.2. Ce réarrangement aboutit à un chromosome 22 plus court qui porte le nom de la ville où il a été découvert en 1960 : le chromosome de Philadelphie (Ch ph) avec comme conséquence moléculaire génération d'un oncogène de fusion BCR-ABL1, qui à son tour se traduit par une Oncoprotéine BCR-ABL1(3). Cette dernière possède une forte activité tyrosine kinase (ATK) constitutive et dérégulée qui en stimulant les voies de signalisation en aval telles que RAS, RAF, JUN kinase, MYC et STAT favorise la croissance et la division cellulaire responsable du phénotype leucémique de la maladie(2). Le traitement actuel est basé sur les ITK ; quatre

molécules peuvent être prescrits en première ligne dans la LMC nouvellement diagnostiquée en phase chronique (LMC-CP): l'imatinib (IM) (Glivec®, Novartis), un ITK de 1ère génération, le nilotinib (Tasigna®, Novartis), le dasatinib (Sprycel® Bristol-Myers Squibb), et le bosutinib (Bosulif®, Pfizer), des ITK de 2ème génération (4). Le profil évolutif de la majorité des patients a été transformé par l'arrivée dans les années 2000 de ces thérapeutiques ciblées, ce qui a permis d'améliorer la survie globale à long terme des patients atteignant celle de la population générale (5-7). L'utilisation en première ligne des ITK de première génération (IM) et de deuxième génération (nilotinib et dasatinib) chez les patients nouvellement diagnostiqués a augmenté la proportion de patients obtenant des RMP et stables (8-10). Dans l'étude randomisée LMC IV (n=1503), l'évaluation à long terme de l'imatinib (IM) a montré après 10 ans de suivi, des taux élevés de réponse moléculaire profonde : RM4.0 89 %, RM4.5 72 % et RM5 59 % (11). Ces niveaux profonds de la réponse moléculaire sont devenus la cible à atteindre dans la pratique clinique actuelle pour tenter l'arrêt de traitement et augmenter les chances d'obtenir des RST après l'arrêt du traitement (12, 13). La RST est un objectif primordial dans la stratégie thérapeutique actuelle de la LMC, notamment chez les jeunes et les femmes ayant un désir de parentalité (14). L'arrêt des ITK dans le but d'une RST est devenu une réalité dans la pratique clinique (15).

En effet, en 2017, la Société européenne d'oncologie médicale (ESMO) a introduit l'option d'interruption des ITK hors des essais cliniques (16). Une RMP et maintenue de manière stable à long terme sous ITK est donc essentielle avant de tenter une RST (17, 18). Selon les recommandations de l'intergroupe Français d'étude sur la LMC (FI-LMC), l'arrêt de l'IM est proposé après un minimum de 3 ans de traitement à condition que les patients aient obtenu une réduction d'au moins 4,5 log du transcrite BCR-ABL1 et stable pendant au moins 2 ans (19) tandis que l'ESMO recommande au moins 5 ans de traitement par ITK combinés à une durée de RMP ≥ 2 ans avant l'arrêt de traitement (16). Plusieurs études ont démontré la faisabilité d'arrêter les ITK en toute sécurité, cependant plus de 50 % ne parviendra pas à maintenir une RST (19-24), soulignant l'importance et la nécessité d'un suivi moléculaire régulier de haute qualité pour une sélection rigoureuse des patients éligibles à l'arrêt de traitement et également pour déceler précocement les rechutes (14). Dans cette revue de synthèse, nous décrivons et discutons l'utilisation récente de la ddPCR dans la LMC, en particulier dans les stratégies d'arrêt du traitement par ITK et l'identification des échecs d'arrêt de traitement. Pour ce faire, nous avons effectué une recherche des articles publiés traitant ce sujet. Une revue systématique de la littérature actuelle évaluant la ddPCR dans le contexte de l'arrêt des ITK dans la LMC-PC a été réalisée. Cette recherche a été effectuée dans PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), en utilisant les mots-clés suivants : « CML », « MRD » « ddPCR », « qRT-PCR », « TFR ». Les articles sélectionnés ont été téléchargés et classés dans le logiciel EndNote X via Google scholar.

2. Le suivi moléculaire

Dans la LMC, l'évaluation de la réponse au traitement est assurée par le suivi des transcrits de fusion BCR-ABL1 qui représentent des marqueurs tumoraux extrêmement spécifiques des cellules leucémiques, leur quantité est proportionnelle à la maladie leucémique résiduelle. La présence de ces marqueurs spécifiques, offre une opportunité unique pour la surveillance de la réponse moléculaire durant et pendant l'arrêt du traitement (25). A ce titre ils sont régulièrement quantifiés par la QPCR qui reste la méthode standardisée de référence la plus couramment utilisée pour évaluer la réponse thérapeutique aux ITK et la classification des patients en sous-groupes pronostiques (26). Elle consiste à amplifier et quantifier le transcrite ARNm de BCR-ABL1 à partir d'un prélèvement de sang périphérique du patient, permettant ainsi de situer sa maladie résiduelle, de vérifier l'efficacité du traitement et d'initier un changement d'ITK en cas de non réponse.

L'impact pronostic de la réponse moléculaire précoce a conduit à l'intégration de son évaluation dans la version 2013 de l'ELN, qui recommande un suivi moléculaire tous les trois mois jusqu'à obtention d'une réponse moléculaire majeure (RMM) stable, puis tous les trois à six mois (27). Mais une surveillance plus étroite même après l'obtention d'une RMM est recommandée car la réponse moléculaire est nécessaire pour évaluer l'éligibilité à l'arrêt du traitement (14).

Le niveau d'expression des transcrits BCR-ABL1 exprimé en rapport du nombre de copie de transcrits BCR-ABL1 pour 100 copies de transcrits ABL1 est arbitrairement fixé à 100 avant traitement. Partant de là, la réponse précoce correspond à une réduction d'au moins 1 logarithmes décimaux ou Log10 du niveau d'expression des transcrits BCR-ABL1 à 3 mois ($\leq 10\%$) ; d'au moins 2 Log10 à 6 mois ($\leq 1\%$) et d'une réduction d'au moins 3 log10 à 12 mois ($\leq 0,1\%$) définissant ainsi la RMM. Au-delà de 12 mois le niveau d'expression doit rester inférieur à 0,1% (14, 27). Des réductions supplémentaires de la RMP par rapport à une ligne de base standardisée (selon l'échelle internationale « IS ») sont définies : RM4.0 (réduction de 4 log10 « $\leq 0.01\%$ » ou BCR-ABL1 indétectable avec au moins 10 000 copies d'ABL1), RM 4.5 (réduction de 4,5 log10 « $\leq 0.0032\%$ » ou BCR-ABL1 indétectable avec au moins 32000 copies d'ABL1) et RM 5 (réduction de 5 Log10 « $\leq 0.001\%$ » ou BCR-ABL1 indétectable avec au moins 100.000 copies d'ABL1) (14, 28, 29) (Figure 1).

À l'heure actuelle, la QPCR est la méthode préférée pour la surveillance continue de la LMC. Cependant, elle ne semble pas optimale pour le suivi de la maladie résiduelle en raison de sa LoD estimée à 0.01%, ce qui peut être insuffisant pour surveiller la MRM au moment de l'arrêt du traitement et pendant l'arrêt du traitement. Ceci pourrait indiquer que la LoD de la QPCR pour ces tests est insuffisante pour différencier les patients éligibles à l'arrêt de traitement à ceux n'ayant pas encore atteint le niveau de réponse recherchée. Dans ce cadre, une nouvelle technologie de 3ème génération, la PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) est une méthode alternative de quantification qui confirme de jour en

jour sa supériorité en termes de précision et de sensibilité, ce qui est un avantage lors de la détection de très faibles niveaux des transcrits BCR-ABL1 (12).

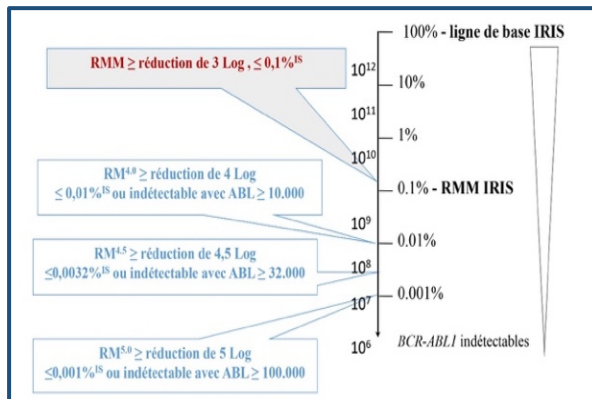


Figure 1. Standardisation de la RMM et RMP.

L'échelle internationale de mesure des transcrits BCR-ABL1 par QPCR est exprimée en pourcentage et raccordée à deux valeurs de référence : 100% qui correspond à la ligne de base standardisée de l'essai IRIS et 0,1% qui correspond à la limite haute de la RMM. $MR^{4.0}$ correspond à un $BCR-ABL1^{IS} \leq 0,01\%$, $MR^{4.5}$ correspond à un $BCR-ABL1^{IS} \leq 0,0032\%$, $MR^{5.0}$ correspond à un $BCR-ABL1^{IS} \leq 0,001\%$ [29].

RMM : Réponse moléculaire majeur; RMP : Réponse moléculaire profonde, ABL : Abelson, IRIS : International Randomized Study of Interferon and ST1571.

3. Le concept de la ddPCR

A l'inverse de la QPCR qui repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide de la fluorescence, la méthode ddPCR est utilisée pour la quantification absolue des acides nucléiques.

Il s'agit d'une technique ultrasensible innovante qui est de plus en plus utilisée en routine, et qui permet avec une très grande sensibilité (jusqu'à 0.001%), une estimation quantitative des mutations et un suivi de la charge tumorale. Le concept de la dPCR a été introduit dans les années quatre-vingt-dix grâce aux développements technologiques notamment dans le domaine de nano-fluidique. Vogelstein et al. (30) ont été les premiers à appliquer les plateformes dPCR dans le domaine oncologique. Cependant, ce n'est qu'à partir de 2007 que l'intérêt pour cette méthode dans le cadre hématologique a progressivement augmenté comme en témoigne le nombre de publications sur la ddPCR qui a augmenté de façon exponentielle (31).

Techniquement, la ddPCR permet une quantification absolue de la séquence d'ADN d'intérêt de façon indépendante de l'efficacité de (la) PCR et sans avoir besoin de réaliser une courbe d'étalonnage, autrement dit, l'utilisation de gamme plasmidique (standards) et de normalisateurs, indispensable en QPCR n'est plus nécessaire, ce qui peut améliorer la reproductibilité entre les laboratoires (32-34). Cette technique repose sur le principe de micro-compartmentation de

l'échantillon, qui sera fractionné et réparti dans plusieurs milliers de gouttelettes "eau-huile" (microgouttelettes) (environ 20.000) ; dans lesquelles la réaction d'amplification PCR de l'ADN cible va se produire en présence de sondes spécifiques fluorescents (26). La détection de la réaction de PCR se fait en point final, basée sur la détection de la fluorescence : On parle de droplet digital PCR (ddPCR) (Figure 2).

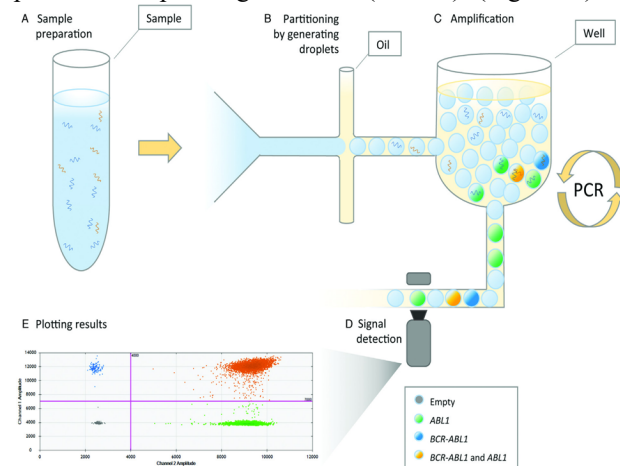


Figure 2. Principe de la ddPCR [75].

A : Préparation des échantillons et du mélange réactionnel

B : Génération des gouttelettes

C : Amplification par PCR standard

D : Lecture des gouttelettes

E : Détection ou non de la fluorescence dans chaque gouttelette et analyse des résultats

Avec cette méthode, le signal exponentiel de la PCR est converti en un signal numérique linéaire qui convient le mieux à l'identification d'une mutation génétique (35). Les résultats s'analysent en comptant le nombre de gouttelettes positives dans l'échantillon d'origine par rapport à leur nombre total et permet ensuite de calculer la concentration (copie/ μ L) de la séquence cible, en appliquant une méthode d'analyse basée sur la loi de Poisson (36).

De nos jours, différents systèmes de PCR numériques ont été développés (Tableau 1) et qui ont tous donné des résultats comparables en ce qui concerne la sensibilité et la spécificité (36). Cependant, la ddPCR est la plateforme numérique la plus couramment utilisée en onco-hématologie (35-38).

La ddPCR offre plusieurs avantages par rapport aux autres formats de PCR ; il s'agit d'une technique très sensible et précise, peu coûteuse plus répétable et plus reproductible (39). En plus, elle est moins sensible aux différents types d'inhibiteurs de la PCR par rapport à la QPCR (40). La partition élevée en gouttelettes rend cette méthode très sensible et potentiellement utile à la fois à des fins de recherche et de diagnostic et particulièrement pour détecter et estimer la MRM. Dans le contexte de la RST qui est devenue un enjeu majeur, en particulier chez les patients jeunes, pour prévenir la survenue de complications à long terme et améliorer la qualité de vie, la ddPCR pourrait constituer un nouvel outil moléculaire non seulement pour la

quantification des transcrits BCR-ABL1 et le suivi de la maladie résiduelle mais également pour l'identification des patients à risque plus élevé de rechute moléculaire pour inefficacité.

Tableau 1: Principales plateformes de la dPCR et leurs caractéristiques

Fournisseur (Pays)	Analyseur	Technologie	Nombre de compartiments	Echantillons par série	Volume réactionnel total (μL)	Durée (heures)	Stratégie de multiplexage	Capacité de multiplexage	Date de commercialisation
Bio-Rad (USA)	QX100/200™	dPCR gouttelettes	20 000 (1nL)	Plaque 96 puits (12 séries de 8)	20	~6	Intensité de fluorescence	2 couleurs 8 cibles	2011
Fluidigm (USA)	BioMark HD™ EP1™	dPCR micro chambres sur puce	12 *765 = 9 180 (6 nL) 48* 770 = 36 960 (0,85 nL)	12 ou 48	8 ou 4	~4	Couleurs	4 couleurs (*UV) 5 cibles	2006
Formulatrix (USA)	Constellation digital PCR™	dPCR micro chambres sur puce	96*496 = 47 616	Plaque 96 puits	10	~3	Couleurs	3 couleurs	2014
RainDance Technologies	RainDrop™	dPCR gouttelettes	1-10 millions (9 pL)	8	10-50	~7-8	Intensité de fluorescence	2 couleurs 10 cibles	2012
Stilla (France)	Naica System™ (Crystal Digital)	dPCR micro chambres sur puce	25 000-30 000	12	20	~2	Couleurs	3 couleurs 3 cibles	2016
Sysmex (Japan)	OncoBEAM test™	BEAMing PCR	5*10 ⁷ beads >1 million	Plaque 96 puits	140	48-72	Couleurs	Jusqu'à 44 cibles 3 couleurs	2016 (OncoBEAM™)
ThermoFischer Scientific (USA)	Open Array Real time PCR system™ QuantStudio 3D™	dPCR micro chambres sur puce	3 072 (33 nL) 20 000 (0,8 nL)	24	14,5	~5	Intensité de fluorescence	2 couleurs cibles	2010

4. Corrélation et sensibilité

Une quantification fiable et comparable des niveaux de transcription BCR-ABL1 est d'une importance cruciale pour prendre des décisions thérapeutiques importantes en temps opportun et aidera à définir les paramètres de l'arrêt du traitement (21, 27). La ddPCR a été utilisée dans plusieurs études de divers types de maladies hématologiques et appliquée avec succès au suivi moléculaire de la LMC (26). C'est une technologie à fort potentiel en termes de sensibilité, de spécificité et de précision, et pour ces raisons, elle convient aux approches de surveillance de la MRM. De plus, le principe de quantification absolue pourrait réduire la variabilité inhérente de la QPCR (41).

En termes de performance, plusieurs études ont signalé une très bonne corrélation entre les deux techniques (41-45). La première étude remonte à 10 ans lorsque Goh et al. (42) ont comparé la dPCR avec la QPCR chez 43 patients présentant divers niveaux de RMP. Les auteurs ont confirmé la très bonne corrélation et de manière reproductible entre les deux techniques ($R^2 = 0,97$). Ultérieurement d'autres travaux ont confirmé ces données (46-48). Dans l'étude récente publiée par Cortès et al. (43), les performances analytiques de la QPCR sur un système de PCR en temps réel ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, Californie, États-Unis) et la ddPCR sur un système de QX200 Droplet Digital (BioRad, Hercules, Californie, USA) ont été évaluées sur série de 50 patients atteints de LMC-PC avec différents niveaux de RM. Fait intéressant, ils ont constaté une très bonne corrélation dans la

classification moléculaire des échantillons (98,7 %) (coefficient kappa $\kappa = 0,94$; IC 95 % : 0,90-0,98 ; $P < 0,001$) et également dans la quantification du transcrit BCR-ABL1 ($R^2 = 0,86$), mais qui a tendance à diminuer dans les échantillons avec un taux de 0,1% (RMM) ou plus (RMP) ($R^2 = 0,73$). Certaines études ont signalé que la ddPCR permet une stratification plus profonde des patients. Dans leur étude, Goh et al. ont montré une amélioration de 2 à 3 log de la LoD par rapport à la QPCR conventionnelle, et que 24 des 32 échantillons ayant des transcrits indétectables en QPCR se sont révélés positifs (BCR-ABL détectables) avec la ddPCR (42). En 2018, Wang et al (47) ont montré que 18% des patients présentant des taux indétectables de BCR-ABL1 en QPCR, était détectables par la ddPCR. Les auteurs ont constaté que les patients qui ont perdu leur RM4.0 présentaient trois mois plus tôt des transcrits quantifiables en ddPCR mais non détectables par la QPCR.

Dans l'essai clinique prospectif non randomisé LAST (Life After Stopping KIs) ayant regroupé 14 centres américains et portant sur 172 patients atteints de LMC-PC (suivi de 36 mois), la ddPCR (Bio-Rad) réalisée sur tous les échantillons avec transcrit BCR-ABL1 indétectable par la QPCR ($n=56$), a pu détecter et quantifier 64,3% (36 sur 56) des cas (24). Ces données suggèrent que la dd-PCR est plus sensible et plus fiable que la technique conventionnelle dans la mesure des RMP (MR4,5 et moins) (46, 47, 49-51).

Ces dernières années, plusieurs études publiées ont confirmé les bonnes performances de la dPCR

notamment dans la détection de faibles concentrations dans les LoD et LoQ de la QPCR. En 2011 déjà, Goh et al. (42) avaient révélé que la sensibilité de la dPCR était 3 fois plus élevée que celle de la QPCR. Furuya et al. (44) ont comparé la QPCR (Ipsogen® BCR-ABL1 Mber IS-MMR DX Kit (Qiagen),) avec la ddPCR sur le système Quant Studio 3D (Thermo Fisher Scientific). L'équipe a rapporté une corrélation élevée ($R = 0,96$) mais avec une LoD plus basse pour la PCR numérique comparativement à la QPCR (0,003 % vs 0,01 %). Les résultats des travaux de wang et al.(47) ont montré que la concentration minimale détectable par la QPCR était de 10^{-5} , alors que celle obtenue par la ddPCR était de 10^{-6} . D'autres études similaires ont validé cette supériorité (Tableau 2).

Tableau 2 : Sensibilité et corrélation de la dPCR selon certaines études dans le contexte de la LMC

Etude	Système de la dPCR	LoD	R ²
Goh et al [42]	Digital Array™ (Fluidigm)	RM7	0,98
Jennings et al [46]	QX100™ (Bio-Rad)	RM6	0.99
Furuya et al [44]	QuantStudio 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific)	RM4,5	0.96
Chung et al [45]	QX200™ (Bio-Rad)	RM5,5	0.996
Nicolini et al [22]	QX200™ (Bio-Rad)	RM4,7	0.99
Franke et al [41]	QX200™ (Bio-Rad)	RM5	0.98

LoD : Limite de détection

R₂ : Coefficient de corrélation

LMC : Leucémie myéloïde chronique

RM : Réponse moléculaire

Jenning et al (46) ont signalé que la ddPCR offre une sensibilité supérieure d'environ 0,5 à 1 log. Cependant, d'autres études n'ont pas trouvé une augmentation de la sensibilité de la ddPCR par rapport à la QPCR (26, 43). Cortès et al. (43) en appliquant les deux technologies avec le même nombre de réplicats et dans des conditions techniques similaires, n'ont trouvé aucune différence de sensibilité pour la détection de BCR-ABL1 ($P = 0,5$). Les auteurs ont conclu que la ddPCR pourrait être utilisée en milieu clinique, mais elle ne semble pas améliorer davantage la sensibilité de la QPCR et que l'augmentation de la sensibilité de la ddPCR rapportée par les autres travaux est probablement liée à la répétition des analyses effectuées pour la comparaison des deux techniques (43). Dans une étude récente, Smitalova et al.(52) ont évalué les performances de la ddPCR sur un système QX200 Droplet Digital PCR, de la QPCR ainsi que la quantification sur le système fermé « GeneXpert » en utilisant les amorces et sondes standardisés d'Europe Against Cancer (EAC) pour BCR-ABL1 et ABL1. Les auteurs ont montré que la ddPCR fournissait une LoD supérieure à 3 copies BCR-ABL1/échantillon, ce qui correspondait à la sensibilité des méthodes

quantitatives conventionnelles. Néanmoins, la ddPCR a permis de classer plus de 50 % des patients dans différentes catégories de RMP par rapport au GeneXpert.

Des protocoles d'optimisation de la dPCR ont été proposés en augmentant le nombre de réplicats ddPCR et du matériel d'ADN dans les réactions de PCR pour augmenter la quantité d'ARN mesurée et améliorer la sensibilité analytique de la méthode (26, 46, 47, 49, 53).

5. La RST

Les deux premières études cliniques qui ont étudié la possibilité d'arrêter l'IM avec comme objectif principal d'obtenir une RST chez les patients ayant obtenu une RMP ou ceux qui n'ont plus d'ARNm BCR-ABL1 détectable par QPCR, sont l'étude française STIM (17, 54, 55) et l'étude australienne TWISTER (56, 57).

L'évaluation à 02 ans de l'essai STIM a montré que seulement 40 % des patients ont gardé une RMP stable. L'actualisation des données a montré que l'incidence cumulée de la rechute moléculaire est restée à 60 % après un suivi médian de 50 mois (17). Dans l'étude ISAV, 48 % des patients ont rechuté, avec un risque global de rechute à 36 mois de 52 % (58). Dans l'étude EURO-SKI qui a concerné une cohorte plus large ($n=755$) par rapport aux études précédentes, la survie sans rechute moléculaire à 06 mois était de 61 % diminuant à 50 % à 24 mois (12). La rechute d'environ 50 % des cas a été également signalée chez les patients traités par des ITK de deuxième génération(59). En 2017, une méta-analyse ayant recensé 15 études et incluant une cohorte de plus de 500 patients avait montré un taux moyen de 51 % de récurrence moléculaire après arrêt de l'IM (60). Plusieurs essais d'arrêt de l'IM, à partir de l'étude française STIM1, ont montré que la plupart des rechutes surviennent dans les 6 à 12 premiers mois après l'arrêt de traitement (24, 55, 57, 58, 61, 62). Ces données peuvent suggérer deux possibilités, soit la persistance chez ces patients de cellules leucémiques quiescentes ou cellules résiduelles (63), soit un problème lié à sélection de patients éligibles à l'arrêt de traitement.

D'autres études par contre ont trouvé des résultats contrastants. Dans la cohorte de Bernardi et al.(64) ($n=111$), le taux de rechute était plus faible (22%) que celui actuellement rapporté dans la littérature. Selon les auteurs, cela est probablement dû à la durée de traitement prolongé (durée médiane 8,3 ans) et à la durée de la RMP (médiane : 5,9 ans) ainsi qu'au type de transcriteur majeur b3a2 qui était exprimé chez 75% des patients. Cette information est très pertinente qu'il faut également la prendre en considération. En effet, plusieurs études ont récemment confirmé que le transcriteur b3a2 est associé à une meilleure réponse moléculaire au traitement par ITK et un taux plus élevé et une durée significativement plus longue de RMP (65-69) et également à une RST plus longue (70).

6. Quels bénéfices dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle et de RST ?

Le taux important de rechute dans les premiers mois après l'arrêt de traitement impose une surveillance rapprochée de la maladie résiduelle. En effet, selon certains auteurs l'approche de la surveillance intensive (tous les mois) reste justifiée (33).

Les recommandations 2020 de l'ELN recommande une surveillance mensuelle les six premiers mois, puis tous les 2 mois les 6 mois suivants, et au-delà de la première année une surveillance trimestrielle (14). Le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) a proposé par contre un suivi mensuel pendant les 12 premiers mois (71). Dans les recommandations de 2019, NCCN recommande au-delà de 12 mois un suivi moléculaire toutes les 6 semaines pour la deuxième année, et de façon continue tous les 03 mois par la suite pour les patients qui restent en RMM après l'arrêt du traitement par ITK (72).

L'ESMO recommande également une surveillance moléculaire fréquente, effectuée mensuellement au cours du premier semestre, toutes les 6 semaines au cours du second semestre, puis tous les 3 mois par la suite (16). Afin d'augmenter la proportion de patients éligibles à l'arrêt de traitement et d'augmenter les chances de maintenir une RST plus longtemps, des recommandations sur la sélection des patients sont constamment proposées par des experts mondiaux (14, 19, 72, 73).

La QPCR est la méthode couramment utilisée en routine pour la surveillance de la réponse moléculaire qui est devenue de plus en plus exigeante en particulier dans la sélection des patients éligibles à l'arrêt de traitement et également dans le cadre de la prédiction des rechutes. Cependant, cette méthode conventionnelle bien qu'elle est standardisée, n'est peut-être pas l'outil optimal pour surveiller la RMM au moment et pendant l'arrêt du traitement, principalement à cause de sa LoD qui est d'environ 0,01 (RM4.0) à 0,001% (RM5) (26, 29, 74), et également par rapport à sa précision qui est limitée en raison de sa variation technique rendant peut-être la QPCR insuffisante pour quantifier de manière fiable les faibles niveaux de BCR-ABL1 résiduels chez les patients en RMP qui pourraient prétendre à une tentative d'arrêt du traitement par les TKI (75). De plus, dans l'analyse de l'ARNm majeur de BCR-ABL1 en PCR en temps réel, il y a toujours un risque que les résultats diffèrent en raison des différences dans les performances des plateformes utilisées pour la surveillance des transcrits BCR-ABL1 (76). Une grande incertitude demeure également concernant le niveau de la RMP estimé par QPCR à prendre en considération pour prédire le risque de rechute moléculaire (19). Plusieurs niveaux de RMP ont été proposés dans différents essais cliniques et ayant des probabilités significativement plus élevées de maintenir la RST : RM4.0 dans l'essai EURO-SKI (12), RM5.0 dans l'essai JALSG-STIM213 (77), et MR4.5 dans l'essai STIM (17). Cependant, les études cliniques n'ont pas montré de corrélation linéaire entre la profondeur du RMP et le taux de maintien du RST. Il apparaît clairement que la sensibilité et la détectabilité du transcrit BCR-ABL1 sont des éléments supplémentaires importants.

Du fait de sa faible sensibilité, la QPCR n'est pas en mesure de discriminer la profondeur de la réponse chez les patients avec un transcrit BCR-ABL1 indétectable et un patient avec un MR4.0 indétectable pourrait appartenir à MR5.0 (78). La ddPCR pourrait représenter l'outil moléculaire optimal pour identifier

de manière fiable les patients éligibles à l'arrêt de traitement, mais également dans le suivi de la maladie résiduelle et la prédiction précoce de la rechute après l'arrêt de traitement (16). En effet, son principe de quantification absolue sans avoir besoin d'une courbe d'étalonnage en plus de sa reproductibilité, sa sensibilité et sa précision élevées qui en résultent font de cette nouvelle technologie une méthode alternative idéale pour la détection de très faibles niveaux des transcrits BCR-ABL1 et pour fournir des informations plus précoces sur les résultats après l'arrêt des ITK (78, 79).

Plusieurs travaux publiés en onco-hématologie particulièrement dans le contexte de la LMC ont apporté des données favorables à l'utilisation de la ddPCR comme alternative prometteuse pour une évaluation moléculaire précise notamment dans les niveaux bas de BCR-ABL1 mais également en tant que marqueur pronostique qui pourrait aider à prédire une rechute après l'arrêt des ITK plus tôt que la QPCR (22, 58, 80).

Dans l'essai EUROSKEI, aucune valeur prédictive des classes de la RMP c'est-à-dire MR4.0 vs MR5.0 ou maladie indétectable, n'a pu être démontrée lors de l'utilisation de la QPCR (12). Selon les auteurs ceci est dû probablement à sa faible précision et sa sensibilité limitée. Cependant, plusieurs études ont confirmé le risque faible de rechute chez les patients ayant des transcrits indétectables par ddPCR au moment de l'arrêt de traitement (22, 24, 58, 64). Dans un suivi longitudinal prospectif ayant concerné 50 patients atteints de LMC avec une RM4.5 indétectable par QPCR, Colafigli et al. (78) ont évalué la valeur prédictive la ddPCR et ont montré qu'elle permet d'anticiper la rechute moléculaire de trois mois par rapport à la QPCR. En effet, les tests réalisés par la ddPCR au moment de l'arrêt de traitement ont montré que chez 22 patients les transcrits BCR-ABL1 étaient détectables à de très faibles concentrations avec une médiane de 0,04 copie/ml, et dont 10 patients (45 %) ont rechuté à un délai médian de 3 mois après arrêt des ITK. Les auteurs ont montré également que le taux de la RST maintenue était significativement plus élevé dans le groupe avec BCR-ABL1 indétectable par ddPCR que dans le groupe avec BCR-ABL1 détectable (86 % vs 50 % ; P = 0,026). Dans l'étude de Atallah et al (24). La probabilité de rechute était beaucoup plus importante chez les patients avec des transcrits BCR-ABL1 indétectables par QPCR (143 patients/172) (83%) mais détectables par ddPCR (56/143) (39%) comparativement à ceux avec des transcrits BCR-ABL1 détectables par QPCR et également ceux dont les transcrits BCR-ABL1 étaient indétectables par les deux techniques (64,3 % vs 50,0% vs 10,3 % ; P < 0,001). Dans l'étude de Goh et al. (42), sept patients qui ont maintenu une négativité par la QPCR ont été suivis pendant plus de 3 ans par dPCR.

Les auteurs ont constaté une baisse continue du transcrit BCR – ABL1 détectée dans les échantillons par la dPCR. Dans une étude italienne, Bernardi et al (81). ont identifié un seuil de 0,468 copies BCR/ABL1/mL au-dessous duquel les patients sont considérés en RMP et auront une durée plus longue de

RST. Dans des travaux plus récents, la même équipe a évalué la ddPCR dans la détection des niveaux de transcrits BCR-ABL1 chez 111 patients avec une RM 4.0 ou plus suivis pendant une durée médiane de 24 mois, ainsi que sa valeur prédictive pour le maintien d'une RST. Les chercheurs ont rapporté que la ddPCR a permis de détecter des transcrits BCR-ABL1 parmi les cas indétectables en QPCR et que l'analyse des échantillons classés par la QPCR en RM 4.0, RM 4.5 et RM 5.0 a montré que le nombre absolu de copies BCR-ABL1 / μL obtenu dans chaque classe par la ddPCR était hétérogène et largement dispersé, indiquant que les patients avec MR4.0 et ceux avec MR4.5 et 5.0 avaient différents niveaux de RMP.

La QPCR n'a pas été en mesure de discriminer les patients présentant un risque plus élevé de perte de la RM après l'arrêt de traitement ($P = 0,81$). Au contraire, selon la ddPCR, les patients avec une RM au-dessus du seuil de 0,468 copies BCR-ABL1/ μL présentaient un taux de rechute significativement plus élevé que les patients ayant un taux de transcrit BCR-ABL1 en dessous de ce seuil 48 % (12/25) vs 14 % (12/86) ; $P = 0,0003$). De plus, la probabilité de maintenir une RST à 2 ans d'arrêt de traitement était significativement plus élevée chez les patients avec un seuil $< 0,468$ en ddPCR que ceux avec ddPCR $\geq 0,468$ (83 vs 52 %, $P = 0,0017$). Les auteurs ont suggéré que la valeur du transcrit $< 0,468$ copie BCR-ABL1/ μL quantifié par dPCR refléterait le seuil le plus approprié pour une probabilité plus élevée de succès d'arrêt du traitement. En effet, dans leur étude, l'analyse univariée a déterminé deux facteurs prédictifs de la RST, la durée de la RMP > 5 ans (HR 0,2855, IC 95 % 0,0931-0,8760, $P = 0,0284$) et la ddPCR (HR 0,2936, IC 95 % 0,1302-0,6618, $P = 0,0031$) mais par l'analyse multivariée, la dPCR a été le seul paramètre associé au TFR qui a conservé sa valeur significative (HR 0,2124, IC 95 % 0,0637-0,7082, $P = 0,0117$) (64). Dans l'essai STIM2 (22), une étude prospective ayant concerné 218 patients atteints de LMC-PC et traités par IM en première ligne, les auteurs ont analysé l'intérêt de la ddPCR dans le suivi des patients après l'arrêt de l'IM. La ddPCR a été testée chez 175 des 218 patients à l'arrêt du traitement. 75 patients étaient indétectables par la QPCR mais détectables en ddPCR avec un taux supérieur à la valeur seuil positive estimée à 0,0013 % IS équivalent à 4,9 log de sensibilité. L'incidence cumulative de la récurrence moléculaire à 24 mois après l'arrêt de l'IM était significativement plus élevée chez les patients avec une ddPCR positive supérieure au seuil de 0,0023 % IS déterminé avec l'analyse ROC, que chez les patients avec moins de 0,0023 % (68 vs 46 %, $P = 0,0053$). L'étude des facteurs prédictifs de la rechute a montré que la durée du traitement par ITK (> 74 mois) (HR 0,635, IC 95% 0,415-0,972 ; $P = 0,0366$) et une valeur de ddPCR $> 0,0023\%$ (HR 0,556, IC 95% 0,360-0,858 ; $P = 0,0081$) étaient des facteurs prédictifs de la récurrence moléculaire.

Dans l'essai multicentrique ISAV qui a été le premier essai à évaluer la valeur prédictive de la RMP, Mori et al (58) ont montré que parmi les patients avec des taux indétectables en QPCR près de 25 % ont présenté un résultat dPCR positif et que le taux de rechute était

significativement plus élevé dans le groupe dPCR positif que dans le groupe dPCR négatif, démontrant une valeur prédictif négatif (VPN) de 57 % ($p = 0,002$). Malgré l'hétérogénéité dans la conception des travaux et des plateformes de dPCR utilisées, la plupart des études ont démontré que la ddPCR améliore l'estimation de la MRM et permet de mieux sélectionner les candidats à l'arrêt des ITK et également peut être un outil prédictif très important pour identifier les patients à risque élevé de rechute.

Conclusion

La ddPCR est un outil prometteur plus précis et plus sensible qui peut pallier certaines lacunes inévitables de la QPCR et qui pourrait dans un avenir proche devenir la principale technique de surveillance pour sélectionner les meilleurs candidats pour la RST et pour la surveillance précoce de la rechute moléculaire. Nous pensons que son utilisation chez les patients avec des transcrits indétectables par QPCR qui ne devraient pas être considérés comme totalement guéris en raison de sa limite de sensibilité, pourrait mieux définir les niveaux de RMP chez ces patients. Enfin le coût élevé des différentes plateformes et l'absence de standardisation à l'échelle internationale limitent pour l'instant l'introduction de cette méthode dans la pratique clinique.

Conflit d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt

Bibliographie

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;127(20):2391-405.
2. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American journal of hematology*. 2020;95(6):691-709.
3. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-3.
4. Hehlmann R. Chronic myeloid leukemia in 2020. *Hemasphere*. 2020;4(5).
5. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(10):917-27.
6. Welch HG, Kramer BS, Black WC. Epidemiologic signatures in cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(14):1378-86.
7. Pfirrmann M, Baccarani M, Sauße S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(1):48-56.
8. Cortes J, Rea D, Lipton JH. Treatment-free remission with first-and second-generation tyrosine kinase inhibitors. *American journal of hematology*. 2019;94(3):346-57.

9. Hehlmann R, Laussek M, Sauße S, Pfirrmann M, Krause S, Kolb H, et al. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia*. 2017;31(11):2398-406.
10. Hughes TP, Saglio G, Larson RA, Kantarjian HM, Kim D-W, Issaragrisil S, et al. Long-term outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase receiving frontline nilotinib versus imatinib: ENESTnd 10-year analysis. *American Society of Hematology Washington, DC*; 2019.
11. Möbius S, Schenk T, Himsel D, Maier J, Franke G-N, Saussele S, et al. Results of the European survey on the assessment of deep molecular response in chronic phase CML patients during tyrosine kinase inhibitor therapy (EUREKA registry). *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2019;145(6):1645-50.
12. Saussele S, Richter J, Guilhot J, Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Almeida A, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *The Lancet Oncology*. 2018;19(6):747-57.
13. Chamoun K, Kantarjian H, Atallah R, Gonzalez GN, Issa GC, Rios MB, et al. Tyrosine kinase inhibitor discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia: a single-institution experience. *Journal of hematology & oncology*. 2019;12(1):1-10.
14. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966-84.
15. Ross DM, Hughes TP. Treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukaemia. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020;17(8):493-503.
16. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, Mahon F-X, Janssen JJ, Hjorth-Hansen H, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2017;28:iv41-iv51.
17. Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguot F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(11):1029-35.
18. Hochhaus A, Masszi T, Giles F, Radich J, Ross D, Casares MG, et al. Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the ENESTfreedom study. *Leukemia*. 2017;31(7):1525-31.
19. Rea D, Ame S, Berger M, Cayuela JM, Charbonnier A, Coiteux V, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia: recommendations for clinical practice from the French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *Cancer*. 2018;124(14):2956-63.
20. Rea D, Cayuela J-M. Treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukemia. *International journal of hematology*. 2018;108(4):355-64.
21. Saussele S, Richter J, Hochhaus A, Mahon F. The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(8):1638-47.
22. Nicolini FE, Dulucq S, Boureau L, Cony-Makhoul P, Charbonnier A, Escoffre-Barbe M, et al. Evaluation of residual disease and TKI duration are critical predictive factors for molecular recurrence after stopping imatinib first-line in chronic phase CML patients. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(22):6606-13.
23. Dragani M, Rege Cambrin G, Berchiolla P, Dogliotti I, Rosti G, Castagnetti F, et al. A Retrospective Analysis about Frequency of Monitoring in Italian Chronic Myeloid Leukemia Patients after Discontinuation. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(11):3692.
24. Atallah E, Schiffer CA, Radich JP, Weinfurt KP, Zhang M-J, Pinilla-Ibarz J, et al. Assessment of outcomes after stopping tyrosine kinase inhibitors among patients with chronic myeloid leukemia: a nonrandomized clinical trial. *JAMA oncology*. 2021;7(1):42-50.
25. Shanmuganathan N, Hughes TP. Molecular monitoring in CML: how deep? How often? How should it influence therapy? *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*. 2018;2018(1):168-76.
26. Alikian M, Whale AS, Akiki S, Piechocki K, Torrado C, Myint T, et al. RT-qPCR and RT-digital PCR: a comparison of different platforms for the evaluation of residual disease in chronic myeloid leukemia. *Clinical chemistry*. 2017;63(2):525-31.
27. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;122(6):872-84.
28. Cross N, White H, Müller M, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(10):2172.
29. Cross N, White H, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(5):999-1003.
30. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital pcr. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(16):9236-41.
31. Morley AA. Digital PCR: A brief history. *Biomolecular detection and quantification*. 2014;1(1):1-2.
32. Koizumi Y, Furuya D, Endo T, Asanuma K, Yanagihara N, Takahashi S. Quantification of Wilms' tumor 1 mRNA by digital polymerase chain reaction. *International journal of hematology*. 2018;107(2):230-4.
33. Cross NC, White HE, Evans PA, Hancock J, Copland M, Milojkovic D, et al. Consensus on BCR-ABL 1 reporting in chronic myeloid leukaemia in the UK. *British journal of haematology*. 2018;182(6):777-88.

34. White RA, Blainey PC, Fan HC, Quake SR. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC genomics*. 2009;10(1):1-12.
35. Cilloni D, Petiti J, Rosso V, Andreani G, Dragani M, Fava C, et al. Digital PCR in myeloid malignancies: ready to replace quantitative PCR? *International journal of molecular sciences*. 2019;20(9):2249.
36. Coccaro N, Tota G, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. Digital PCR: a reliable tool for analyzing and monitoring hematologic malignancies. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(9):3141.
37. Takamatsu H. Comparison of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry, ASO-qPCR, droplet digital PCR, and deep sequencing in patients with multiple myeloma who underwent autologous stem cell transplantation. *Journal of Clinical Medicine*. 2017;6(10):91.
38. Della Starza I, Chiaretti S, De Propriis MS, Elia L, Cavalli M, De Novi LA, et al. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: technical and clinical advances. *Frontiers in Oncology*. 2019;9:726.
39. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical chemistry*. 2013;59(6):892-902.
40. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clinical chemistry*. 2015;61(1):79-88.
41. Franke G-N, Maier J, Wildenberger K, Cross M, Giles FJ, Müller MC, et al. Comparison of real-time quantitative PCR and digital droplet PCR for BCR-ABL1 monitoring in patients with chronic myeloid leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2020;22(1):81-9.
42. Goh H-G, Lin M, Fukushima T, Saglio G, Kim D, Choi S-Y, et al. Sensitive quantitation of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia using nanofluidic digital polymerase chain reaction assay. *Leukemia & lymphoma*. 2011;52(5):896-904.
43. Cortés AA, Olmedillas S, Serrano-López J, Lainez-González D, Castaño T, Iñiguez R, et al. Comparison of Droplet Digital PCR versus qPCR Measurements on the International Scale for the Molecular Monitoring of Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2020;24(5):593-600.
44. Furuya D, Moriai M, Koizumi Y, Endo T, Asanuma K, Yanagihara N, et al. Analysis of major BCR-ABL1 mRNA by digital polymerase chain reaction is useful for prediction of international scale. *International journal of clinical oncology*. 2019;24(7):871-5.
45. Chung H-J, Hur M, Yoon S, Hwang K, Lim H-S, Kim H, et al. Performance evaluation of the QXDx BCR-ABL% IS droplet digital PCR assay. *Annals of laboratory medicine*. 2020;40(1):72-5.
46. Jennings LJ, George D, Czech J, Yu M, Joseph L. Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2014;16(2):174-9.
47. Wang WJ, Zheng CF, Liu Z, Tan YH, Chen XH, Zhao BL, et al. Droplet digital PCR for BCR/ABL (P210) detection of chronic myeloid leukemia: A high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression. *European journal of haematology*. 2018;101(3):291-6.
48. Park H, Shin D-Y, Kim I, Sohn S-K, Koh Y, Lee J-H, et al. Use of droplet digital polymerase chain reaction for detecting minimal residual disease: A prospective multi-institutional study. *in vivo*. 2019;33(6):2273-80.
49. Maier J, Lange T, Cross M, Wildenberger K, Niederwieser D, Franke G-N. Optimized digital droplet PCR for BCR-ABL. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2019;21(1):27-37.
50. Maier J, Franke G-N, Schubert K, Wildenberger K, Cross M, Niederwieser D, et al. A comparison of droplet digital PCR and quantitative RT-PCR for low level BCR-ABL in CML patients with molecular responses. *American Society of Hematology Washington, DC*; 2014.
51. Marum JE, Branford S. Current developments in molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. *Therapeutic advances in hematology*. 2016;7(5):237-51.
52. Smitalova D, Dvorakova D, Racil Z, Romzova M. Digital PCR can provide improved BCR-ABL1 detection in chronic myeloid leukemia patients in deep molecular response and sensitivity of standard quantitative methods using EAC assays. *Practical laboratory medicine*. 2021;25:e00210.
53. Bernardi S, Bonifacio M, Iurlo A, Zanaglio C, Tiribelli M, Binotto G, et al. "Variant-specific discrepancy when quantitating BCR-ABL1 e13a2 and e14a2 transcripts using the Europe Against Cancer qPCR assay." Is dPCR the key? *European journal of haematology*. 2019;103(3):272-3.
54. Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Charbonnier A, et al. Long-term follow-up of the French Stop Imatinib (STIM1) study in patients with chronic myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology*. 2017;35(3):298-305.
55. Rousselot P, Huguet F, Rea D, Legros L, Cayuela JM, Maarek O, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood*. 2007;109(1):58-60.
56. Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarzer AP, Arthur C, Yeung DT, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;122(4):515-22.
57. Ross DM, Pagani IS, Shanmuganathan N, Kok CH, Seymour JF, Mills AK, et al. Long-term treatment-free remission of chronic myeloid leukemia with falling levels of residual leukemic cells. *Leukemia*. 2018;32(12):2572-9.
58. Mori S, Vagge E, Le Coutre P, Abruzzese E, Martino B, Pungolino E, et al. Age and d PCR can predict relapse in CML patients who discontinued imatinib: The ISAV study. *American journal of hematology*. 2015;90(10):910-4.
59. Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, Rousselot P, Guilhot F, Gardembas M, et al. Dasatinib or nilotinib

- discontinuation in chronic phase (CP)-chronic myeloid leukemia (CML) patients (pts) with durably undetectable BCR-ABL transcripts: interim analysis of the STOP 2G-TKI study with a minimum follow-up of 12 months—on behalf of the French CML Group Filmc. American Society of Hematology Washington, DC; 2014.
60. Campiotti L, Suter MB, Guasti L, Piazza R, Gambacorti-Passerini C, Grandi AM, et al. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: a systematic review and a meta-analysis. *European Journal of Cancer*. 2017;77:48-56.
 61. Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, Agape P, Nicolini FE, Varet B, et al. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *Journal of clinical oncology*. 2014;32(5):424-30.
 62. Rousselot P, Loiseau C, Delord M, Cayuela JM, Spentchian M. Late molecular recurrences in patients with chronic myeloid leukemia experiencing treatment-free remission. *Blood advances*. 2020;4(13):3034-40.
 63. Mahon F-X. Discontinuation of TKI therapy and 'functional' cure for CML. *Best practice & research Clinical haematology*. 2016;29(3):308-13.
 64. Bernardi S, Malagola M, Zanaglio C, Polverelli N, Dereli Eke E, D'Adda M, et al. Digital PCR improves the quantitation of DMR and the selection of CML candidates to TKIs discontinuation. *Cancer medicine*. 2019;8(5):2041-55.
 65. Ercaliskan A, Eskazan AE. The impact of BCR-ABL1 transcript type on tyrosine kinase inhibitor responses and outcomes in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2018;124(19):3806-18.
 66. Castagnetti F, Gugliotta G, Breccia M, Iurlo A, Levato L, Albano F, et al. The BCR-ABL1 transcript type influences response and outcome in P hiladelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib. *American journal of hematology*. 2017;92(8):797-805.
 67. Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *haematologica*. 2014;99(9):1441.
 68. Nachi M, Kihel I, Entasoltane B, Brahimi M, Yafour N, Guella D, et al. Impact of the major BCR-ABL1 transcript type on clinical and biological parameters and molecular response in patients with chronic myeloid leukemia. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. 2020.
 69. Farina M, D'adda M, Schieppati F, Cerqui E, Rossi G, editors. THE IMPACT OF DIFFERENT BCR-ABL1 Transcript On Outcome Of Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients: A Monocentric Real Life Experience. *haematologica*; 2017: FERRATA STORTI FOUNDATION VIA GIUSEPPE BELLI 4, 27100 Pavia, Italy.
 70. D'adda M, Farina M, Schieppati F, Cerqui E, Ruggeri G, Ferrari S, et al. An e13a2 type of BCR-ABL transcript has a significant adverse impact on the achievement of a sustained deep molecular response and on the maintenance of a treatment free remission after stopping tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2017;130(Supplement 1):1589-.
 71. Paller A, Altman JK, Berman E, Abboud CN, Bhatnagar B, Curtin P, et al. NCCN guidelines insights: chronic myeloid leukemia, version 1.2017. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2016;14(12):1505-12.
 72. Network NCC. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Chronic Myelogenous Leukemia; Version 1. 2016 [Internet]. National Comprehensive Cancer Network; 2016 [cited 2016 Feb 20].
 73. Saussele S, Richter J, Guilhot J, Hjorth-Hansen H, Almeida AMd, Janssen JJ, et al. "Duration of Deep Molecular Response" Has Most Impact on the Success of Cessation of Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment in Chronic Myeloid Leukemia-Results from the EURO-SKI Trial. *American Society of Hematology Washington, DC*; 2017.
 74. Branford S, Cross N, Hochhaus A, Radich J, Saglio G, Kaeda J, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2006;20(11):1925-30.
 75. Kockerols CC, Valk PJ, Levin M-D, Pallisgaard N, Cornelissen JJ, Westerweel PE. Digital PCR for BCR-ABL1 quantification in CML: current applications in clinical practice. *Hemasphere*. 2020;4(6).
 76. Cross NC, Hochhaus A, Müller MC. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: principles and interlaboratory standardization. *Annals of hematology*. 2015;94(2):219-25.
 77. Takahashi N, Tauchi T, Kitamura K, Miyamura K, Saburi Y, Hatta Y, et al. Deeper molecular response is a predictive factor for treatment-free remission after imatinib discontinuation in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia: the JALSG-STIM213 study. *International journal of hematology*. 2018;107(2):185-93.
 78. Colafigli G, Scalzulli E, Di Prima A, Pepe S, Loglisci MG, Diverio D, et al. Digital droplet PCR as a predictive tool for successful discontinuation outcome in chronic myeloid leukemia: Is it time to introduce it in the clinical practice? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2020:103163.
 79. Phenix-Lan Q, Martin S, Eric B. dPCR: A Technology Review. *Sensors*. 2018;18(4):1271.
 80. Colafigli G, Scalzulli E, Porrazzo M, Diverio D, Loglisci MG, Latagliata R, et al. Digital droplet PCR at the time of TKI discontinuation in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients is predictive of treatment-free remission outcome. *Hematological oncology*. 2019;37(5):652-4.
 81. Bernardi S, Ruggieri G, Malagola M, Cancelli V, Cattina F, Polverelli N, et al. Digital PCR (Dpcr) a step forward to detection and quantification of minimal residual disease (MRD) in Ph+/BCR-ABL1 chronic myeloid leukemia (CML). *J Mol Biomark Diagn*. 2017;8(03):1-3.