

Journées TACT

Suivi des patients greffés

Philippe Moskovtchenko



HLA- Généralités

Définitions

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Organisation conservée dans les espèces animales
Chez l'homme :
Système **HLA** : Human Leucocyte Antigen

Mise en évidence

Jean DAUSSET (1958)
Ag MAC (= HLA-A2)

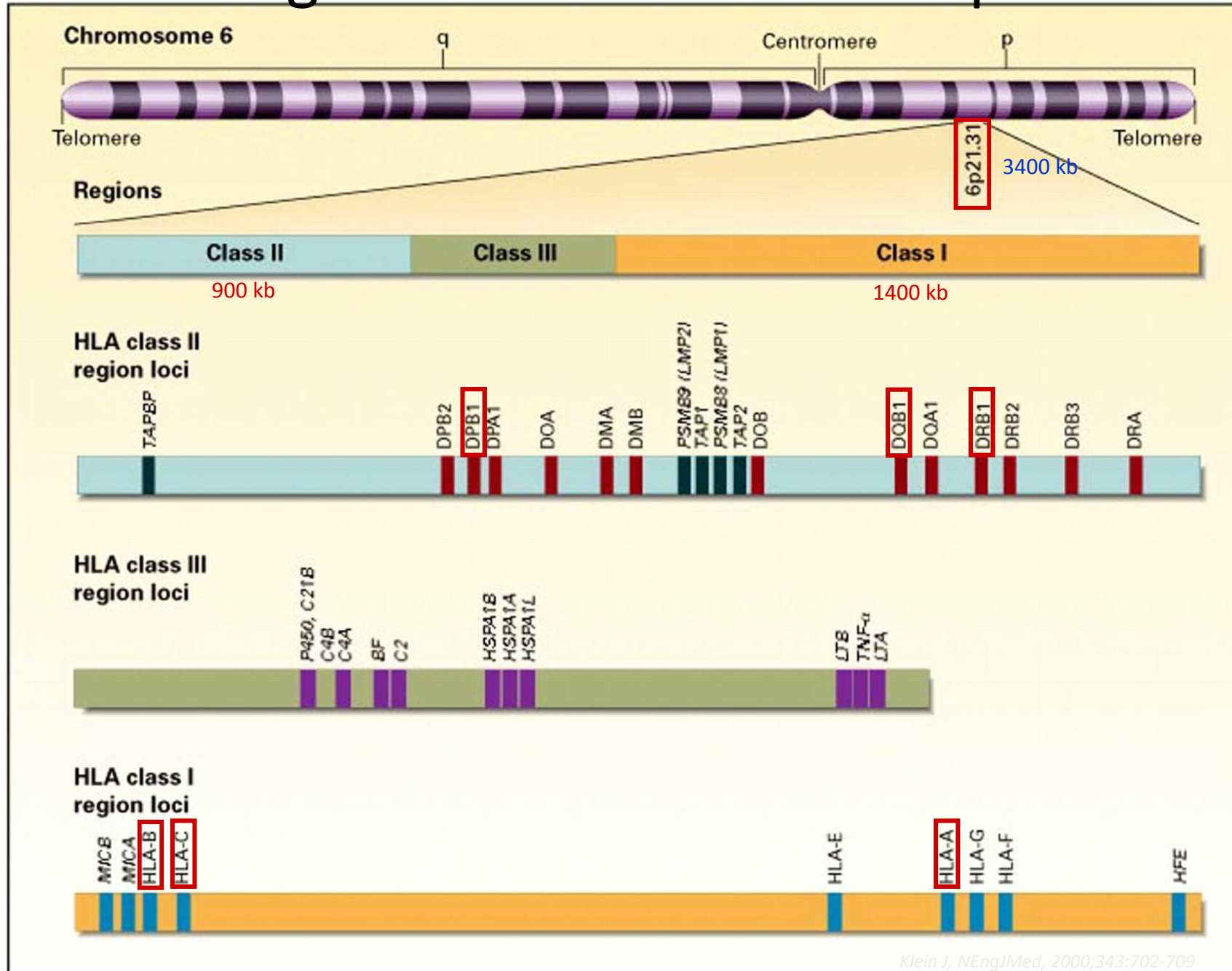
➔ Ag leucocytaires pouvant
entraîner la synthèse d'Ac
spécifiques



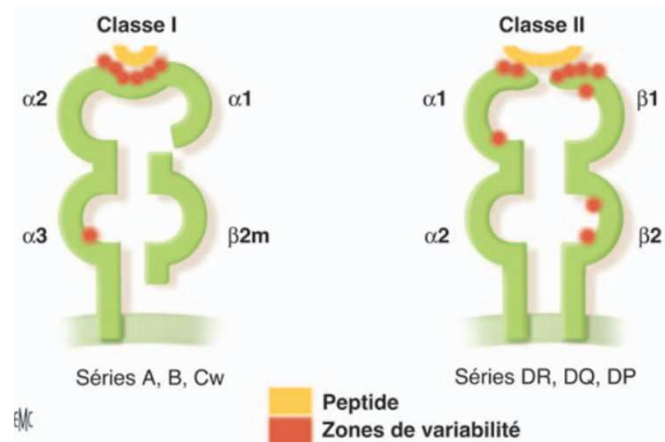
HLA- Généralités

- Organisation chromosomique :
 - Codé par des gènes localisés chez l'homme sur le bras court du **chromosome 6**(6p21)
 - Plusieurs régions :
 - **Classe I** : locus A, B, C
 - **Classe II** : locus DR, DQ, DP
 - **Classe III** : gènes non HLA, mais dont certaines possèdent des fonctions dans l'immunité (TNF, HSP, fractions du C')

Organisation chromosomique



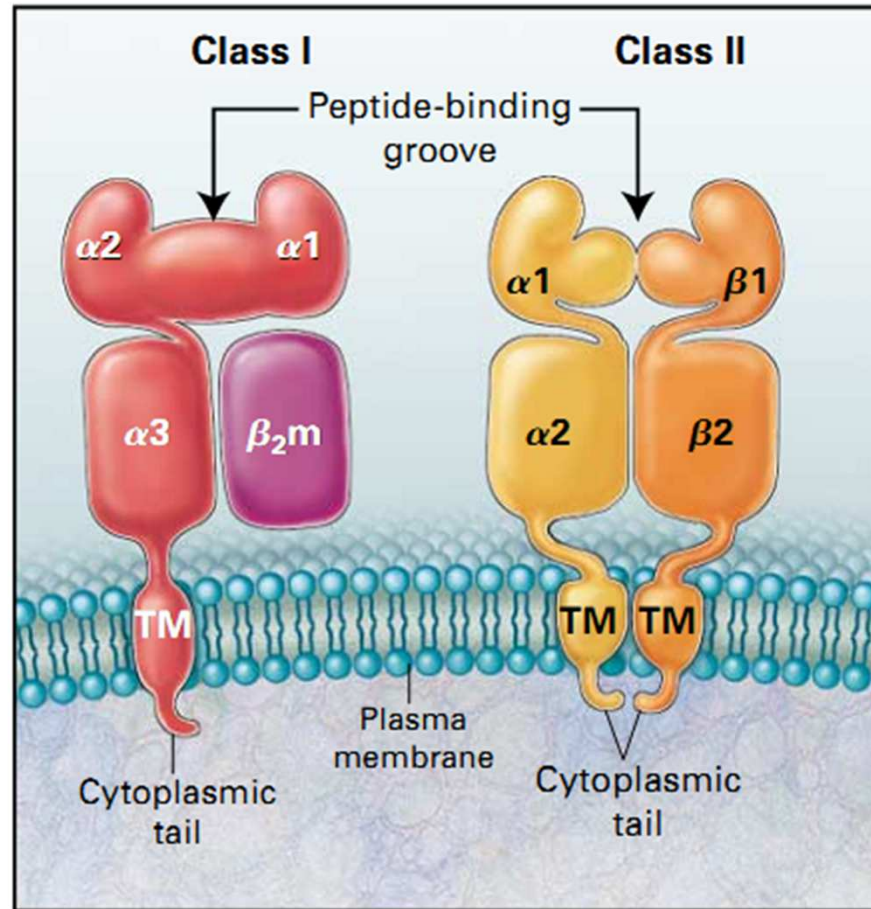
Les molécules HLA



Molécules classe I : **A, B, C**

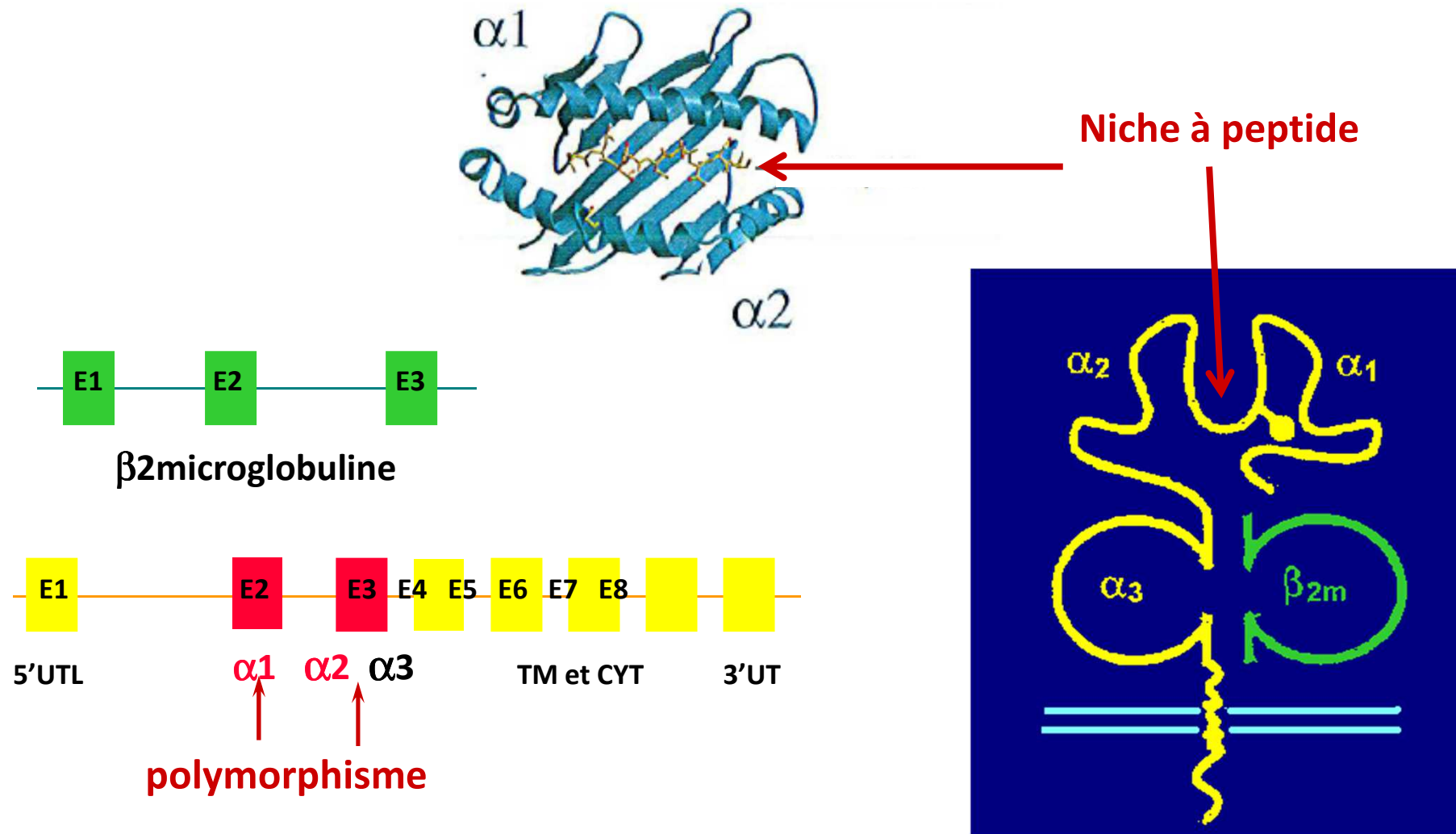
Molécules classe II : **DP, DQ, DR**

Molécules HLA



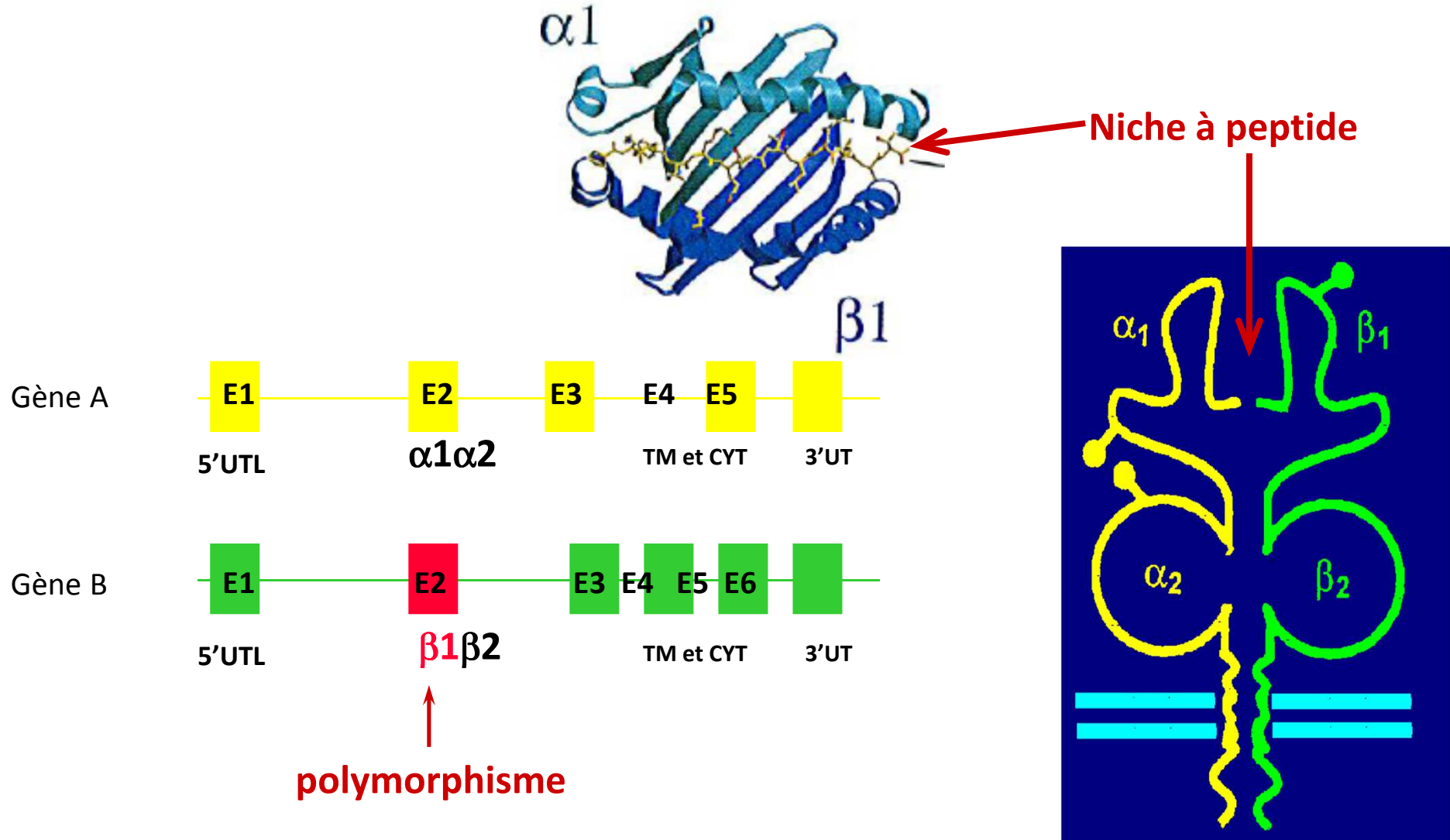
Molécule HLA de classe I

- Organisation des gènes en exons (séquences codantes) séparées par des introns (séquences non codantes), qui reflète la structure de la protéine en domaines



Molécule HLA de classe II

- Organisation des gènes en exons (séquences codantes) séparées par des introns (séquences non codantes), qui reflète la structure de la protéine en domaines



Expression des molécules HLA

- Distribution tissulaire

- **Classe I :**

- Sur **toutes les cellules nucléées** (de 10^4 à 5×10^5 mol/cellule)
 - Absent des hématies, présent sur les plaquettes
 - Augmentation de l'expression par les interférons de type I
 - Possibilité de **perte de l'expression** (infection virale, cellules tumorales)
 - ↳ Interaction avec les LT CD8 et L NK

- **Classe II :**

- Constitutif sur les **cellules présentatrices d'Ag** (cellules dendritiques, LB, macrophages) (10^5 mol/cellule)
 - **Induction** de l'expression par l'Interféron γ sur les autres cellules
 - ↳ Interaction avec les LT CD4

Diversité molécules HLA :

24 spécificités HLA-A x2

50 spécificités HLA-B x2 ...



Diversité des individus !!!!

| | | | | |
|----------|----------|----------|-----------|-------------------------------|
| A1 | B5 | B49 (21) | Cw1 | |
| A2 | B7 | B50 (21) | Cw2 | |
| A3 | B8 | B51 (5) | Cw3 | |
| A9 | B12 | B52 (5) | Cw4 | |
| A10 | B13 | B53 | Cw5 | |
| A11 | B14 | B54 (22) | Cw6 | |
| A19 | B15 | B55 (22) | Cw7 | |
| A23 (9) | B16 | B56 (22) | Cw8 | |
| A24 (9) | B17 | B57 (17) | Cw9 (w3) | |
| A25 (10) | B18 | B58 (17) | Cw10 (w3) | |
| A26(10) | B21 | B59 | | |
| A28 | B22 | B60 (40) | | |
| A29 (19) | B27 | B61 (40) | DR1 | DR51 (15, 16) |
| | | | | DR52 (17, 18, 11, 12, 13, 14) |
| A30 (19) | B35 | B62 (15) | D103 | DR53 (4, 7, 9) |
| A31 (19) | B37 | B63 (15) | DR2 | |
| A32 (19) | B38 (16) | B64 (14) | DR3 | |
| A33 (19) | B39 (16) | B65 (14) | DR4 | |
| A34 (10) | B40 | B67 | DR5 | DQ1 |
| A36 | B41 | B70 | DR6 | DQ2 |
| A43 | B42 | B71 (70) | DR7 | DQ |
| A66 (10) | B44 (12) | B72 (70) | DR8 | DQ4 |
| A68 (28) | B45 (12) | B73 | DR9 | DQ5(1) |
| A69 (28) | B46 | B75 (15) | DR10 | DQ6 (1) |
| A74 (19) | B47 | B76 (15) | DR11 (5) | DQ7 (3) |
| A80 | B48 | B77 (15) | DR12 (5) | DQ8 (3) |
| | | B78 | DR13 (6) | DQ9 (3) |
| | | B81 | DR14 (6) | |
| | | Bw4 | DR15 (2) | |
| | | Bw6 | DR16 (2) | |
| | | | DR17 (3) | |
| | | | DR18 (3) | |

Polymorphisme HLA

| Numbers of HLA Alleles | |
|------------------------|--------|
| HLA Class I Alleles | 9,232 |
| HLA Class II Alleles | 3,010 |
| HLA Alleles | 12,242 |

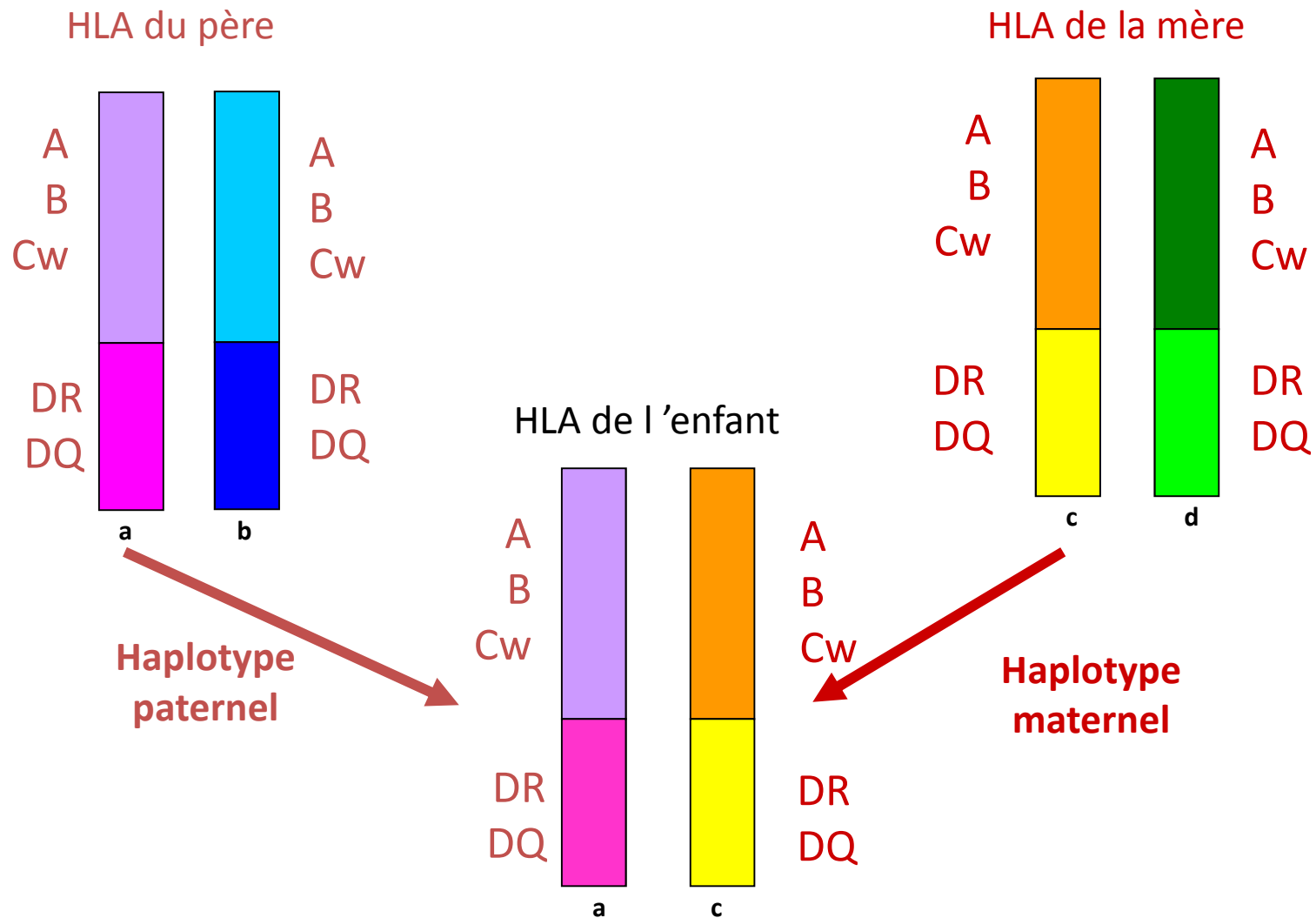
Décembre 2014

| HLA Class I | | | |
|-------------|-------|-------|-------|
| Gene | A | B | C |
| Alleles | 2,946 | 3,693 | 2,466 |
| Proteins | 2,077 | 2,741 | 1,739 |
| Nulls | 138 | 122 | 74 |

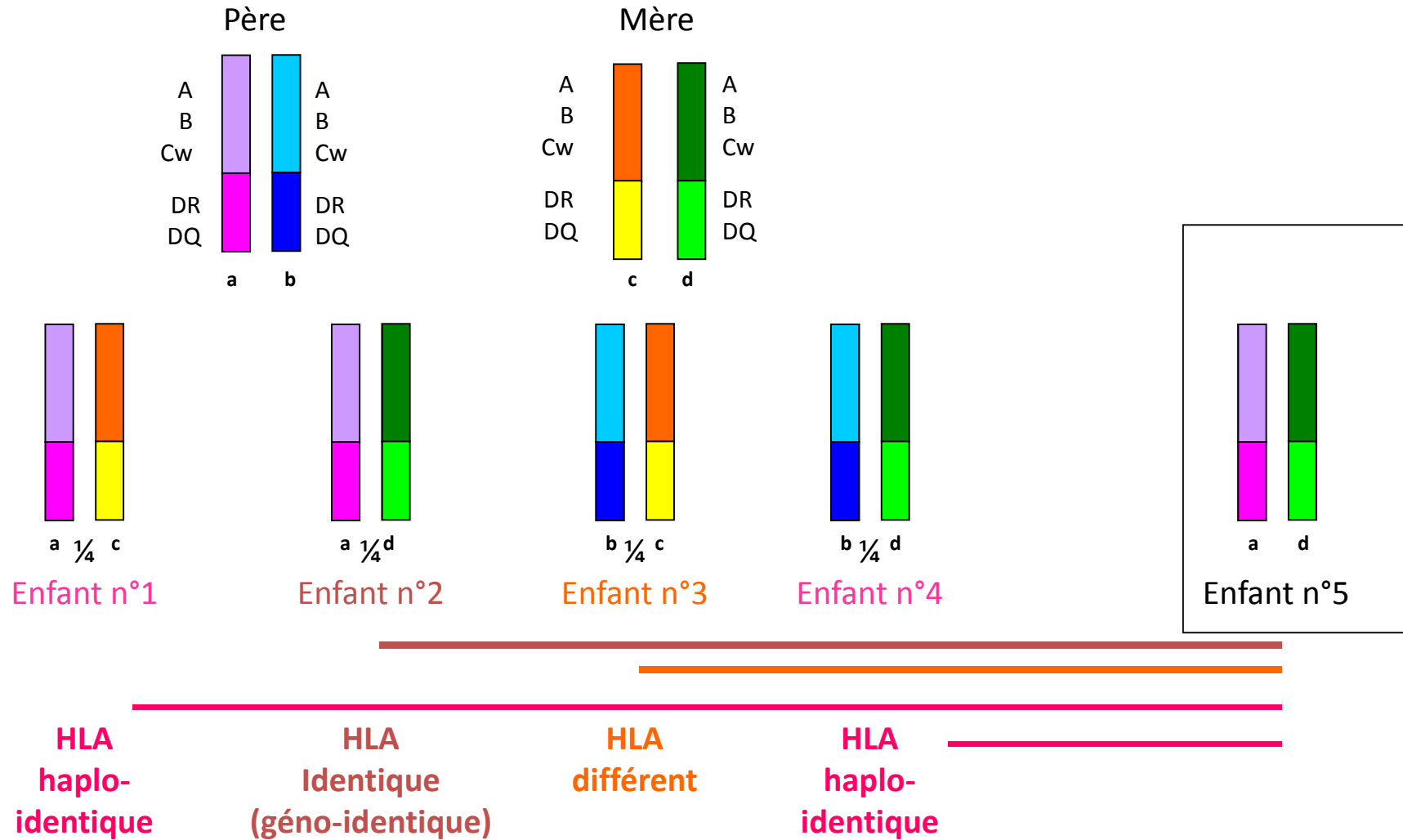
| HLA Class II | | | | | | |
|--------------|-----|-------|------|------|------|------|
| Gene | DRA | DRB | DQA1 | DQB1 | DPA1 | DPB1 |
| Alleles | 7 | 1,684 | 52 | 712 | 38 | 472 |
| Proteins | 2 | 1,237 | 32 | 473 | 19 | 390 |
| Nulls | 0 | 42 | 1 | 17 | 0 | 13 |

Différences entre 2 allèles = différences de une ou plusieurs bases : insertion, délétion, mutation, substitution, recombinaison ...

Héritage des haplotypes HLA



Compatibilité HLA dans une famille



Déséquilibre de liaison

- Distribution des allèles de CMH dans la population :

| Numbers of HLA Alleles | |
|------------------------|--------|
| HLA Class I Alleles | 9,232 |
| HLA Class II Alleles | 3,010 |
| HLA Alleles | 12,242 |

Environ 10^{17} combinaisons possibles

- En réalité, les allèles ne sont **pas distribués au hasard** dans la population :
 - L'association de certains allèles dans un haplotype est rencontrée avec une fréquence plus grande que ne le voudrait le hasard

| Groupe d'allèles | Fréquence (%) | | |
|------------------|---------------|-------|-------|
| | CAU | AFR | ASI |
| HLA-A1 | 15.18 | 5.72 | 4.48 |
| HLA-A2 | 28.65 | 18.88 | 24.63 |
| HLA-A3 | 13.38 | 8.44 | 2.64 |
| HLA-A28 | 4.46 | 9.92 | 1.76 |
| HLA-A36 | 0.02 | 1.88 | 0.01 |

CAU = caucasien
AFR = africain
ASI = asiatique

Fréquences des haplotypes HLA-A, B, C, DRB1, DQB1

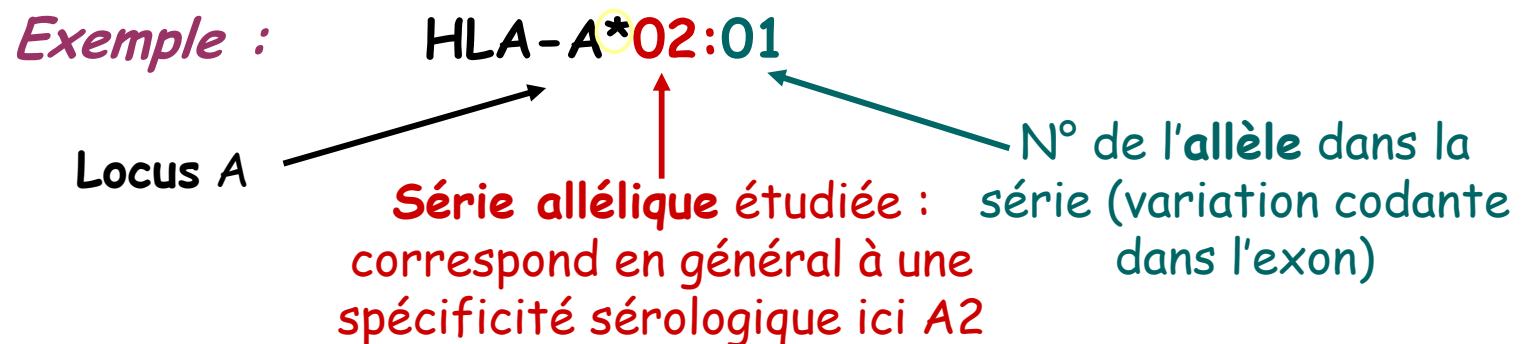
| Allèles | | | | | European Americans (white/caucasien) 15734 haplotypes | | | African Americans 2294 haplotypes | | | Asians (Asians ans Pacific Islanders) 2250 haplotypes <small>(Les donneurs asiatiques représentent environ 5% du nombre total du</small> | | | Hispanics 2138 haplotypes | | |
|---------|--------|--------|-------|--------|---|------|--|--------------------------------------|------|--|--|------|--|------------------------------|------|--|
| HLA-A | HLA-C | HLA-B | DRB1 | DQB1 | Fréquence | Rang | Fréquence attendu de l'haplotype sur le BMDW | Fréquence | Rang | Fréquence attendu de l'haplotype sur le BMDW | Fréquence | Rang | Fréquence attendu de l'haplotype sur le BMDW | Fréquence | Rang | Fréquence attendu de l'haplotype sur le BMDW |
| 01 01g | 07 01g | 08 01g | 03 01 | 02 01g | 0,07408 | 1 | 0,070376 | 0,01391 | 2 | 0,000696 | 0,00089 | 313 | 0,000045 | 0,01784 | 1 | 0,000143 |
| 03 01g | 07 02 | 07 02g | 15 01 | 06 02 | 0,03547 | 2 | 0,033697 | 0,00915 | 3 | 0,000458 | 0,00000 | NA | 0,000000 | 0,01278 | 3 | 0,000102 |
| 24 02g | 07 01g | 18 01g | 04 01 | 03 02 | 0,02436 | 3 | 0,023142 | 0,00430 | 11 | 0,000215 | 0,00000 | NA | 0,000000 | 0,00266 | 38 | 0,000021 |
| 02 01g | 07 02 | 07 02g | 15 01 | 06 02 | 0,02341 | 4 | 0,022240 | 0,00305 | 22 | 0,000153 | 0,00048 | 368 | 0,000024 | 0,00705 | 8 | 0,000056 |
| 29 02 | 16 01 | 44 03 | 07 01 | 02 01g | 0,01829 | 5 | 0,017376 | 0,00603 | 8 | 0,000302 | 0,00000 | NA | 0,000000 | 0,01720 | 2 | 0,000138 |
| 01 01g | 06 02 | 57 01 | 07 01 | 03 03 | 0,01273 | 6 | 0,012094 | 0,00174 | 70 | 0,000087 | 0,00755 | 9 | 0,000378 | 0,00327 | 27 | 0,000026 |
| 03 01g | 04 01g | 35 01g | 01 01 | 05 01 | 0,01259 | 7 | 0,011961 | 0,00174 | 75 | 0,000087 | 0,00178 | 69 | 0,000089 | 0,00322 | 28 | 0,000026 |
| 11 01g | 03 03g | 55 01 | 04 01 | 03 02 | 0,01216 | 8 | 0,011552 | 0,00087 | 205 | 0,000044 | 0,00000 | NA | 0,000000 | 0,00187 | 58 | 0,000015 |
| 02 01g | 03 04 | 40 01g | 13 02 | 06 04 | 0,01003 | 9 | 0,009529 | 0,00218 | 53 | 0,000109 | 0,00000 | NA | 0,000000 | 0,00047 | 1002 | 0,000004 |
| 02 01g | 07 01g | 08 01g | 03 01 | 02 01g | 0,00978 | 10 | 0,009291 | 0,00167 | 86 | 0,000084 | 0,00000 | NA | 0,000000 | 0,00283 | 30 | 0,000023 |
| 30 01 | 06 02 | 13 02 | 07 01 | 02 01g | 0,00938 | 11 | 0,008911 | 0,00000 | NA | 0,000000 | 0,00978 | 6 | 0,000489 | 0,00468 | 12 | 0,000037 |
| 02 01g | 06 02 | 57 01 | 07 01 | 03 03 | 0,00843 | 12 | 0,008009 | 0,00044 | 806 | 0,000022 | 0,00039 | 1111 | 0,000020 | 0,00187 | 62 | 0,000015 |
| 24 02g | 07 02 | 07 02g | 15 01 | 06 02 | 0,00795 | 13 | 0,007553 | 0,00131 | 131 | 0,000066 | 0,00178 | 65 | 0,000089 | 0,00106 | 157 | 0,000008 |
| 11 01g | 04 01g | 35 01g | 01 01 | 05 01 | 0,00745 | 14 | 0,007078 | 0,00044 | 595 | 0,000022 | 0,00222 | 52 | 0,000111 | 0,00184 | 71 | 0,000015 |

Données Anne Dormoy

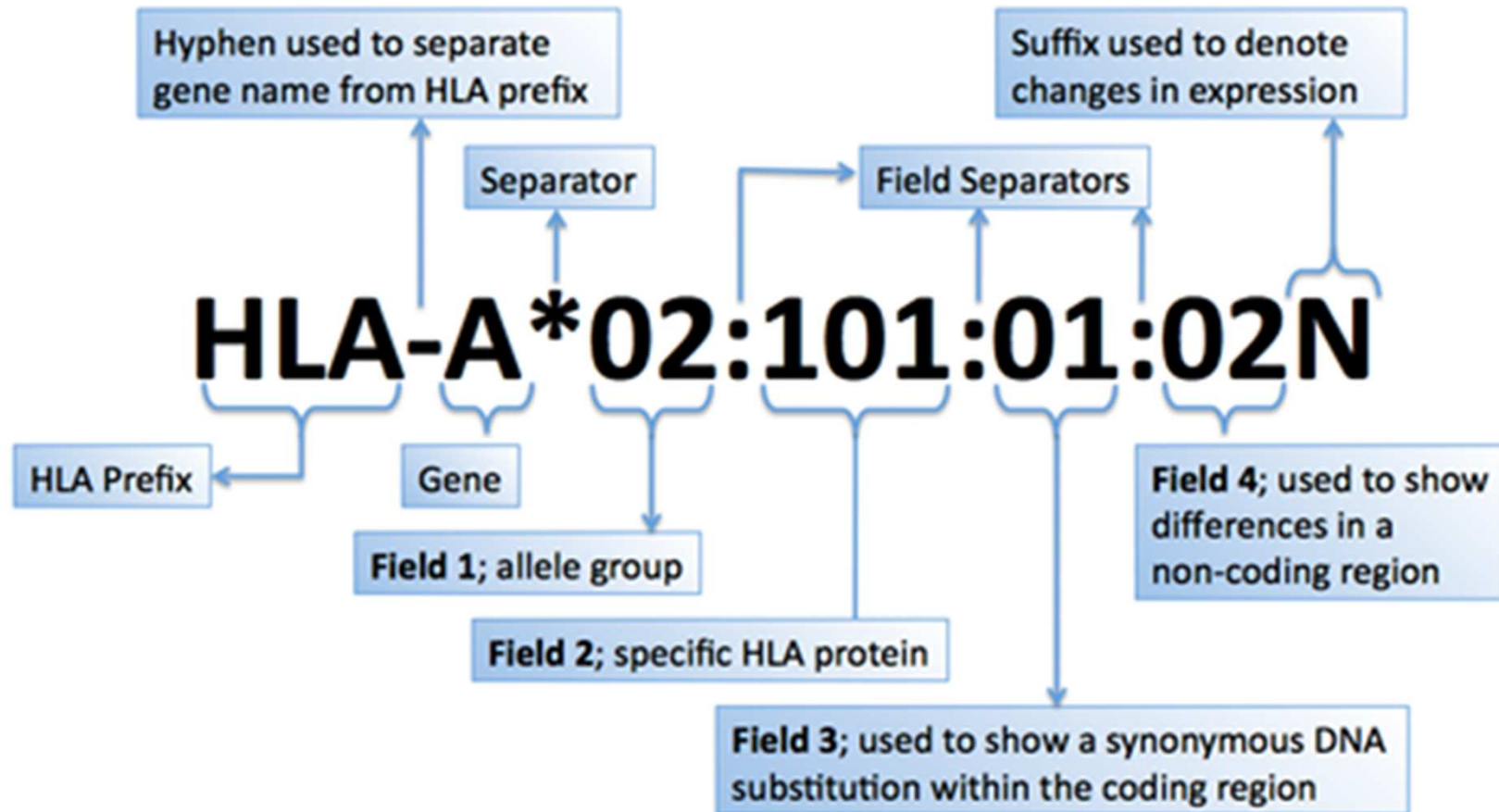
D'après NMDP par Maiers et al 2007

Nomenclature HLA

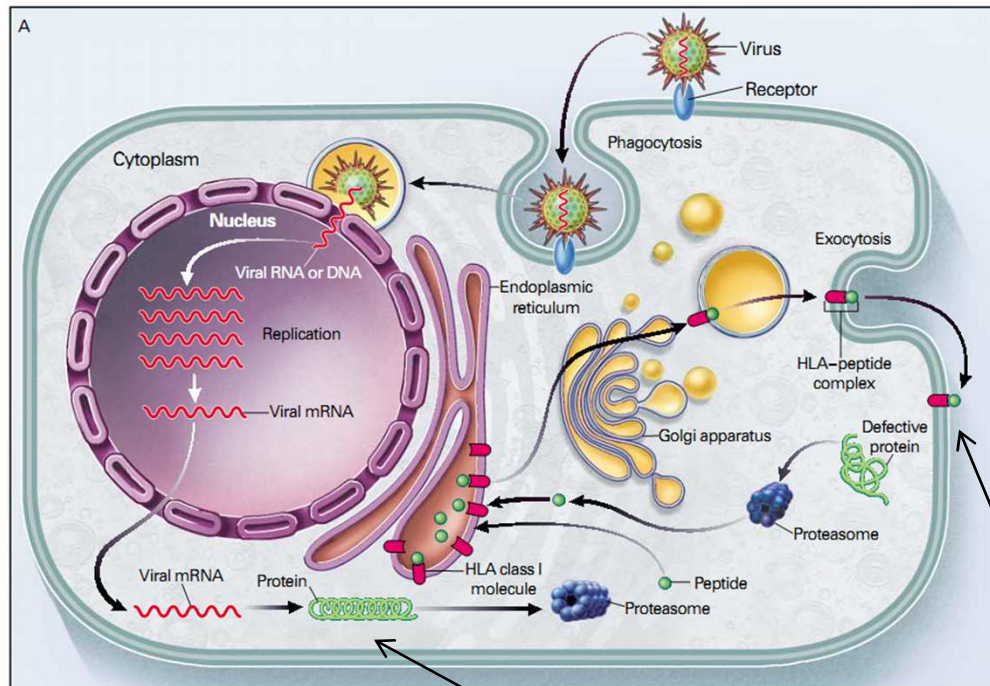
- **Sérologie** :
 - Exemple : HLA-A 2, 3 ; B 7, 8.
- **Biologie moléculaire** : deux niveaux de résolution :
 - Basse résolution (LR) : HLA-A*02, *03 ; B*07, *08.
 - Définition générique = définition sérologique, « 2 digits »
 - Haute résolution (HR) : HLA-A*02:01
 - Définition allélique, spécifique, « 4 digits »



NOMENCLATURE HLA



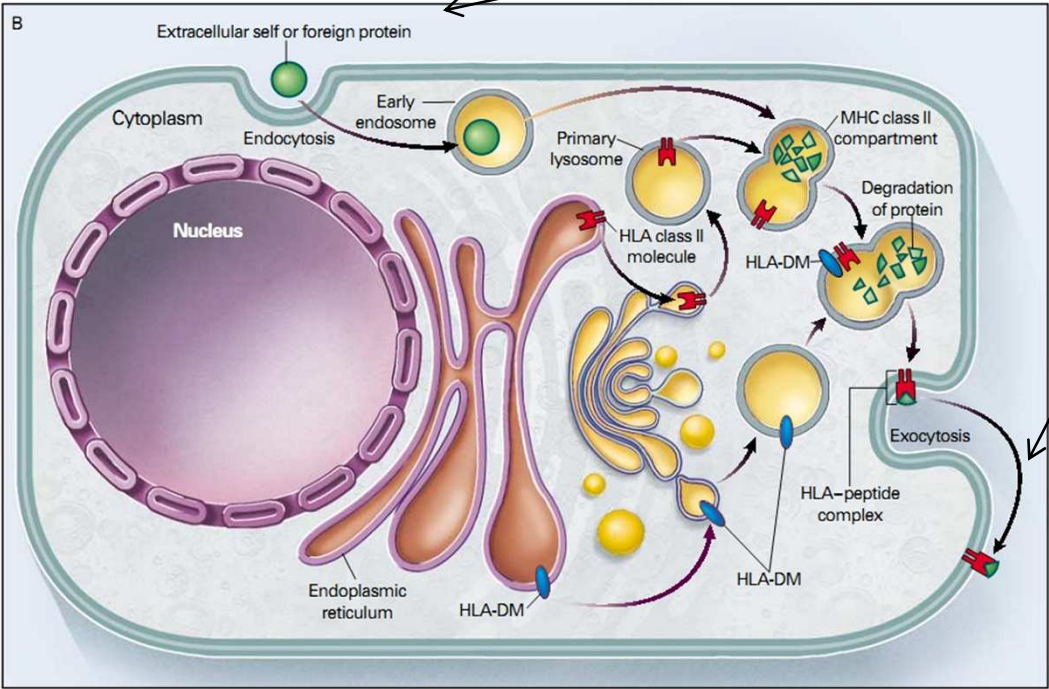
Rôle dans le système immunitaire : présentation de l'antigène



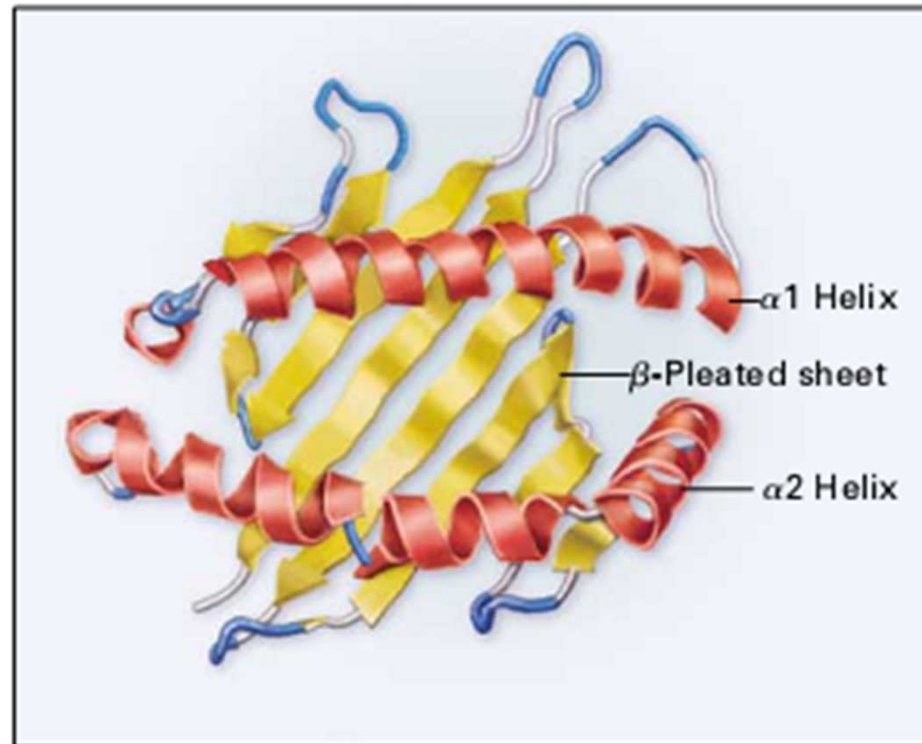
CMH Classe I => intra-cellulaire

Rôle dans le système immunitaire : présentation de l'antigène

CMH classe II => extra-cellulaire



La niche à peptide



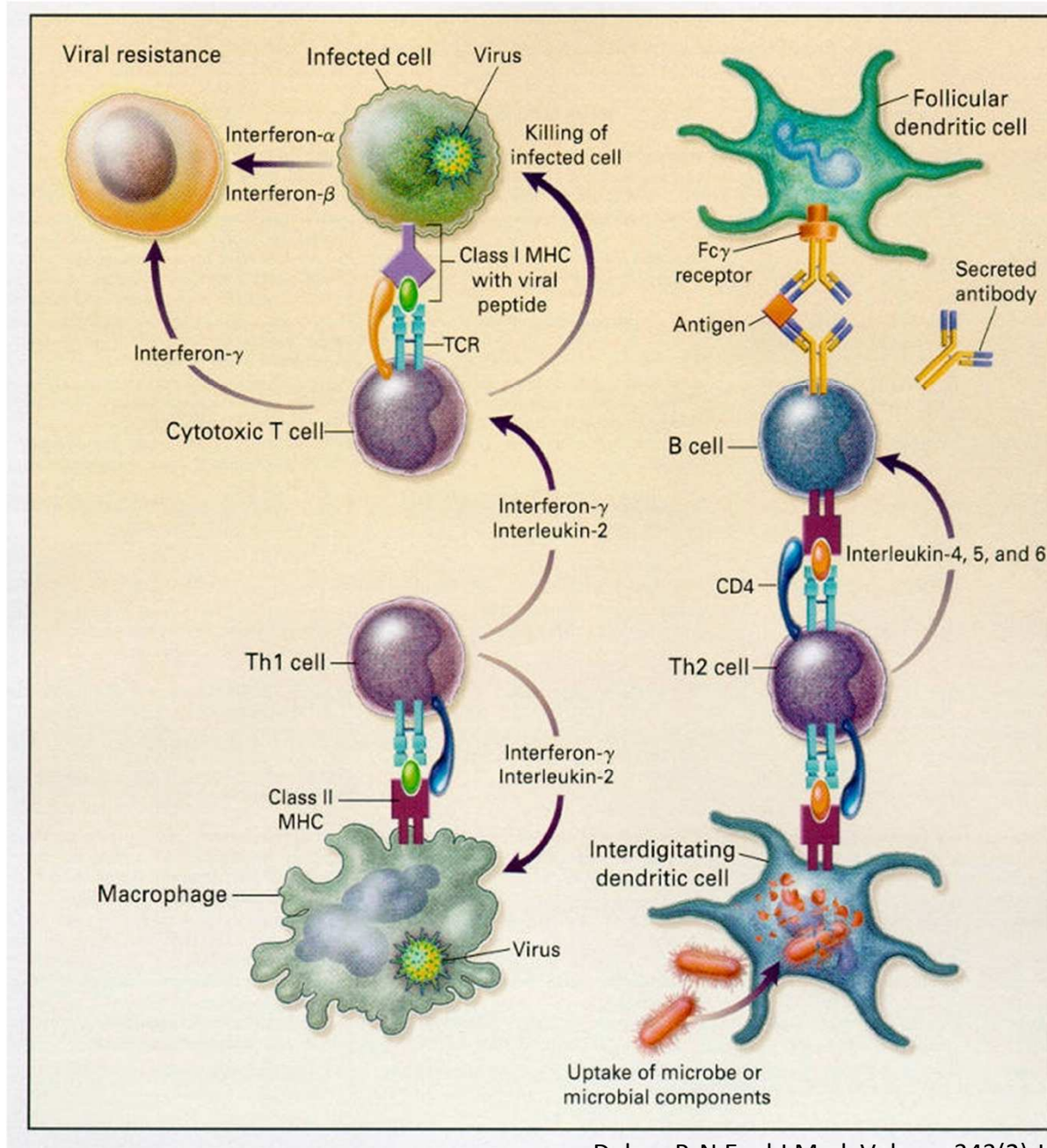
Présentation du peptide aux lymphocytes T

- Prise en charge de **peptides** provenant de la dégradation de protéines issues des **microorganismes** ou du **soi**

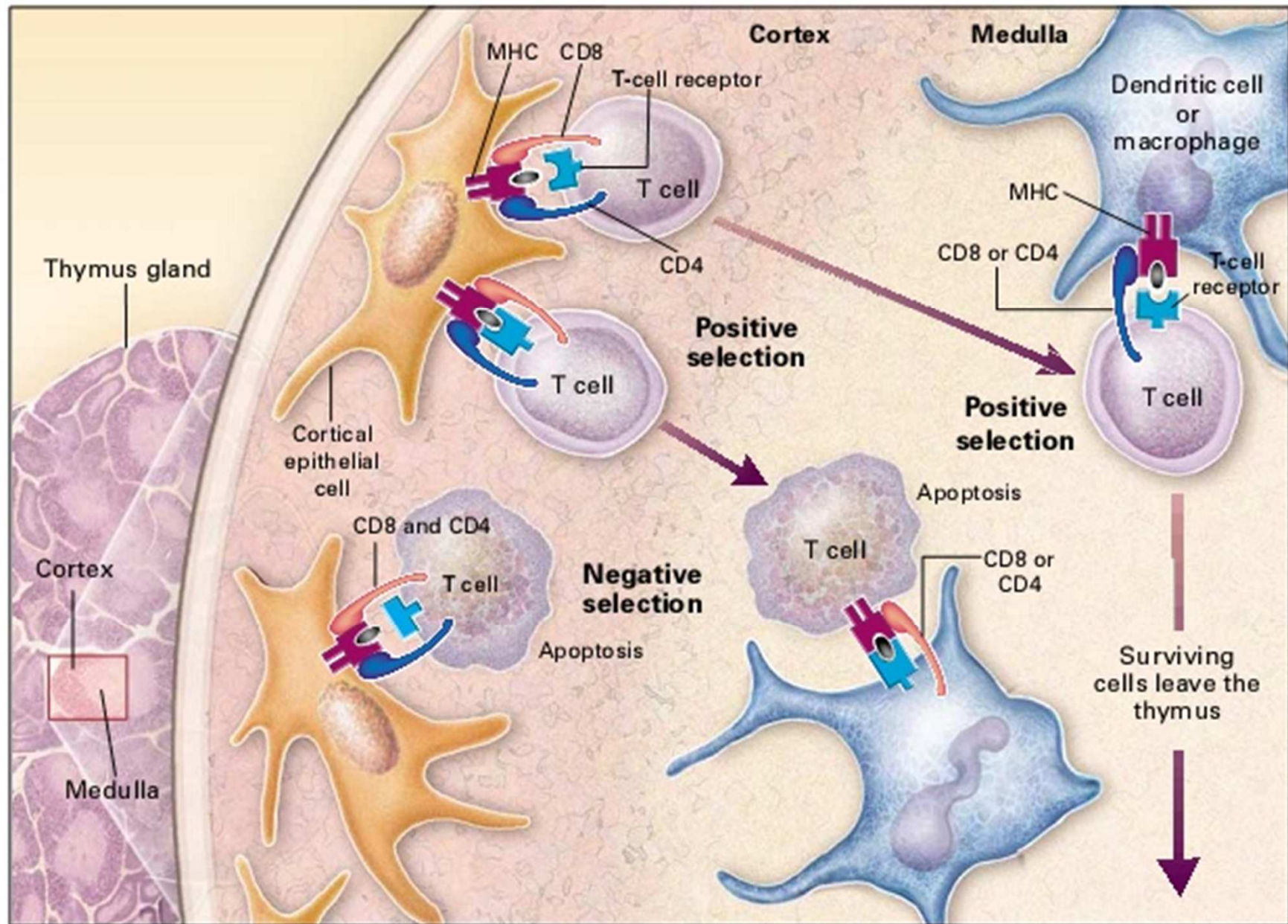
- Acheminement à la surface des cellules pour interagir avec les lymphocytes T (TCR) et NK (KIR)
 - **Classe I** (A, B, C) → LT **CD8**/KIR des NK
 - **Classe II** (DR, DQ, DP) → LT **CD4**

- Rôle de la **niche à peptide** dans ces interactions

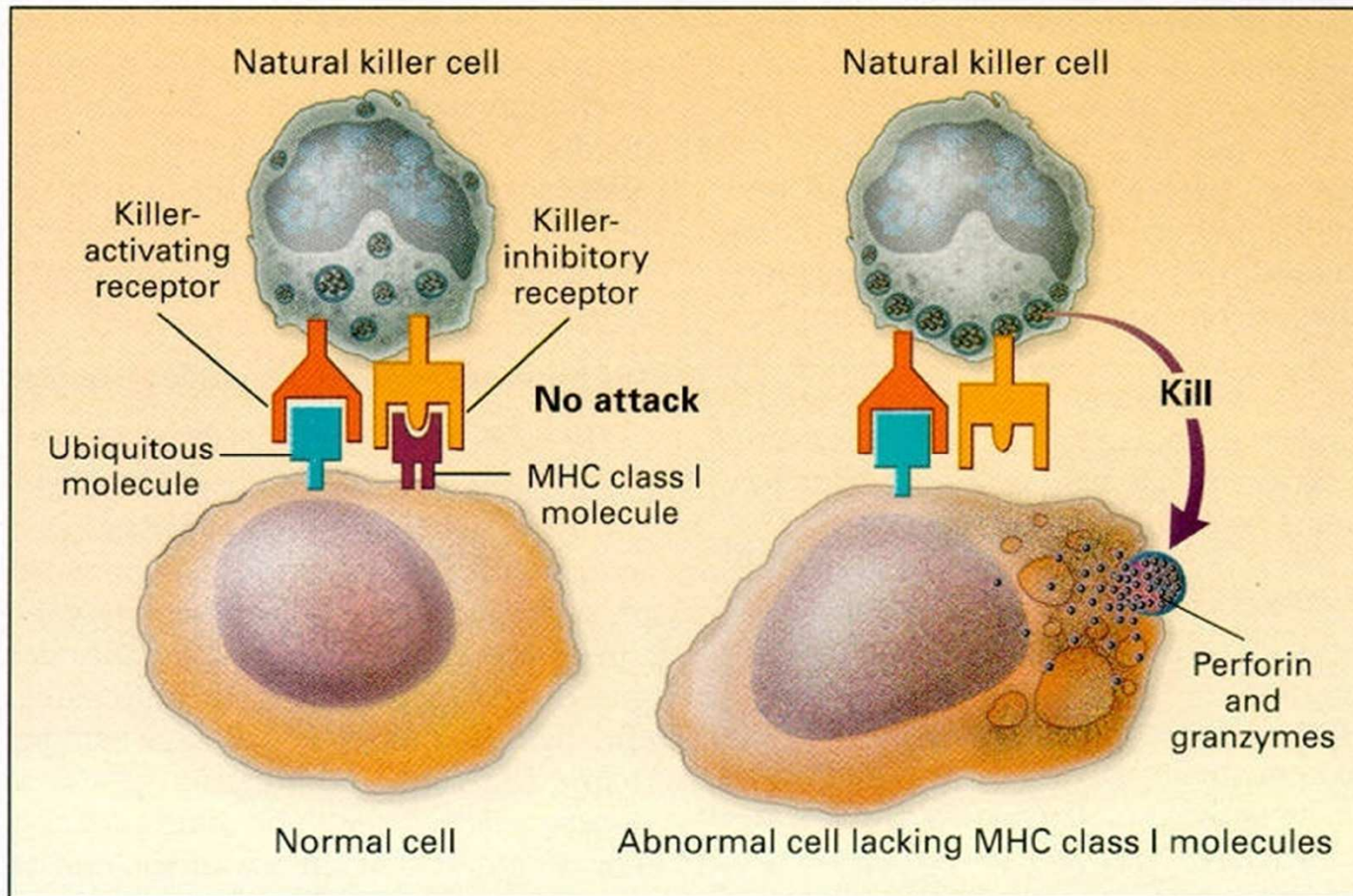
Vue d'ensemble des fonctions lymphocytaires



Éducation des lymphocytes T

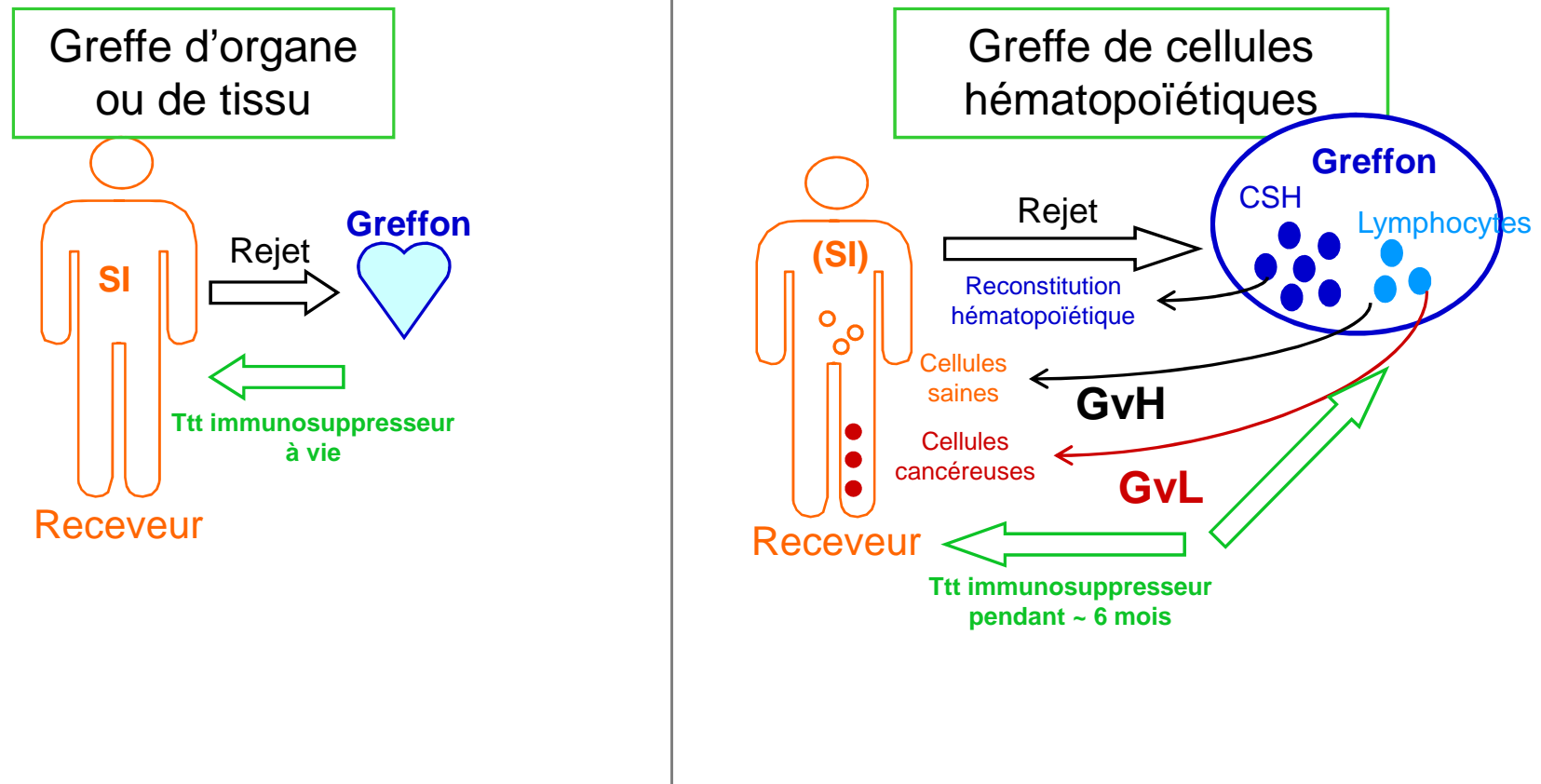


CMH et lymphocytes NK



HLA et transplantation

- Mécanismes immunologiques et conséquences



HLA et transplantation

- Greffe d'organe

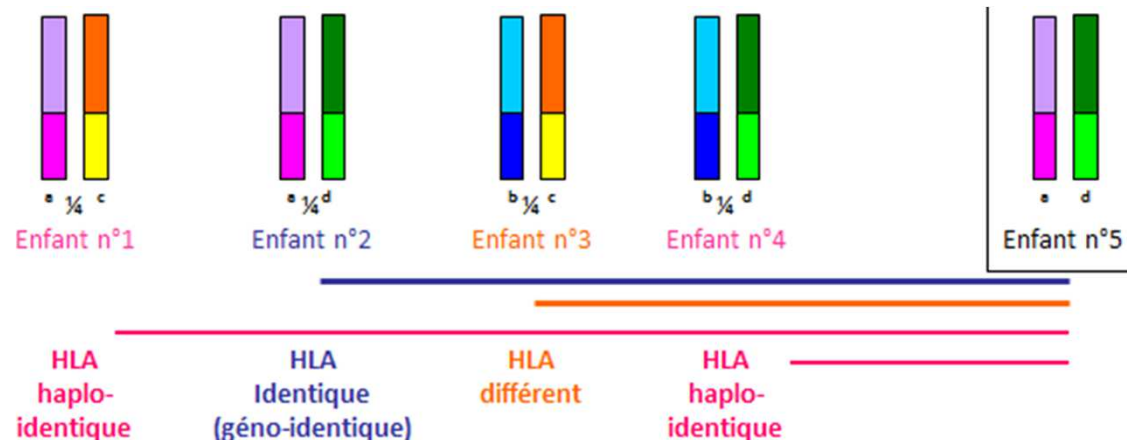
- S'assurer de l'absence chez le receveur d'Ac anti-HLA dirigés contre le donneur

- Greffe compatible avec un cross-match négatif

- Greffe de cellules hématopoïétiques


- Recherche de l'identité HLA

- Dans la famille (greffe géno-identique ou haplo-identique)




Grefe CSH

- Dans des fichiers de donneurs internationaux ([greffe phéno-identique](#))
- Identité [HLA-10/10](#) ou [HLA-9/10](#) (donneurs), [HLA-4,5](#) ou [6/6](#) (USP)



BONE MARROW DONORS WORLDWIDE

Home
What's new?
Mission Statement
BMDW Match Programs 
User Guide
Authorization
Security
Downloads

Welcome to Bone Marrow Donors Worldwide

Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) is the continuing effort to collect the HLA phenotypes and other relevant data of volunteer stem cell donors and cord blood units, and is responsible for the co-ordination of their worldwide distribution. Participants are 73 stem cell donor registries from 52 countries, and 47 cord blood banks from 32 countries.

The current number of donors and cord blood units in the BMDW database is:

24,257,040 (23,646,871 donors and 610,169 CBU's)

There are currently 897 users from 540 organisations authorized to access the on-line BMDW services.

Une bonne nouvelle !!

Bone Marrow Donors Worldwide is celebrating a momentous milestone

Bone Marrow Donors Worldwide is celebrating a momentous milestone: 25 million people are currently listed as potential marrow donors on worldwide donor registries: This record number of registry members gives greater hope to blood cancer patients, caregivers and healthcare professionals around the world





BONE MARROW DONORS WORLDWIDE

[link to homepage](#)

Number of donors/CBU's per registry in BMDW

| | | |
|------------------|------|-----------|
| France | F | 234,624 |
| France CORD ## | FCB | 33,183 |
| Germany | D | 5,729,699 |
| Germany CORD | DCB | 16,298 |
| USA-NMDP | USA1 | 7,675,737 |
| USA-NMDP CORD ## | U1CB | 135,352 |

Total: 24,984,326

24,984,326 (24,361,871 donors and 622,455 CBU's)

Décembre 2014

Greffe CSH

- Greffe HLA identique 10/10 allélique
- Greffe mismatch 9/10 MMA,B ou C

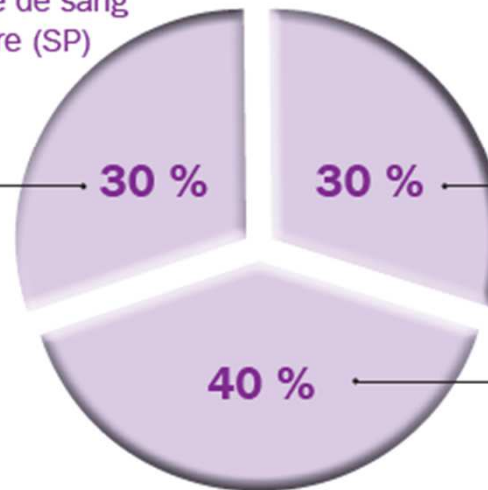
Greffe CSH

Répartition des sources de CSH chez les patients ayant besoin d'une allogreffe

Pas de donneur compatible en MO ou CSHP

30 à 60 % des cas trouvent un greffon compatible dans la banque de sang placentaire (SP)

Greffes de MO ou CSHP à partir d'un donneur familial



Greffes de MO ou CSHP à partir d'un donneur non apparenté

Greffe USP

- Compatibilité 4/6
HLA-A et B
générique et DRB1*
allélique
- Nombre CNT
 $2 \times 10^7 / \text{Kg}$
- Nombre CD34
 $4 \times 10^6 / \text{Kg}$



Greffe CSH

- Possibilité de greffer avec 2 USP
- En respectant compatibilité 4/6 avec le receveur et 4/6 entre elles.
- Permet greffe chez adulte

Suivi des receveurs CSH

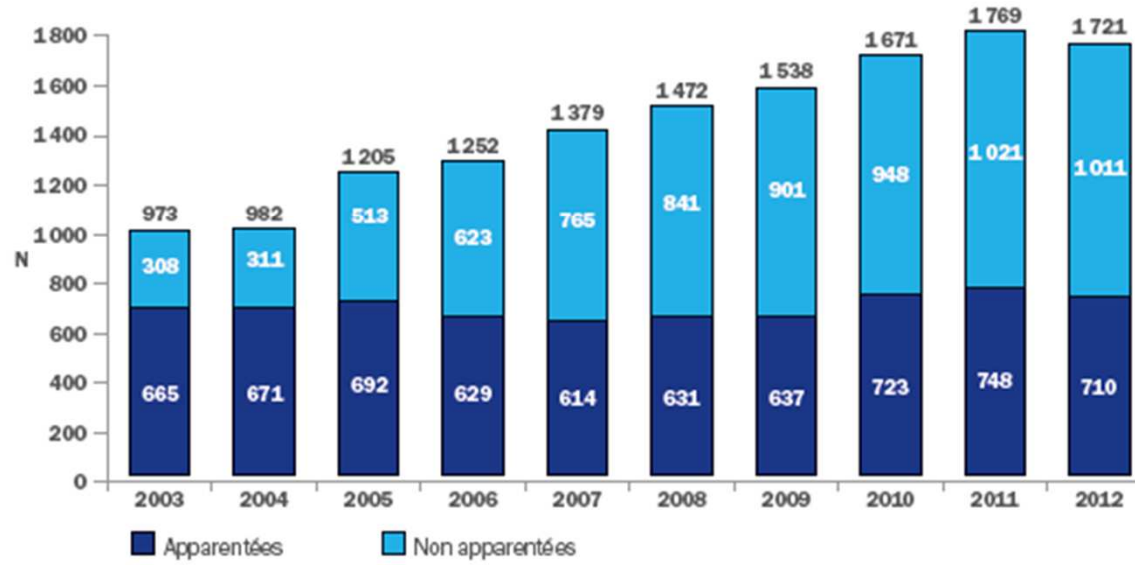
- Etude du chimérisme

Chimérisme et greffe de CSH

- Allogreffe de CSH : traitement classique des hémopathies malignes
- Deux buts
 - Remplacer l'hématopoïèse du receveur
 - Induire une réponse allogénique anti-tumorale

Mise à jour 2012

ÉVOLUTION DU NOMBRE D'ALLOGREFFES DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES SELON LE TYPE DE DONNEUR



Evolution nombre allogreffes

Tableau CSH G1. Evolution du nombre de greffes de CSH

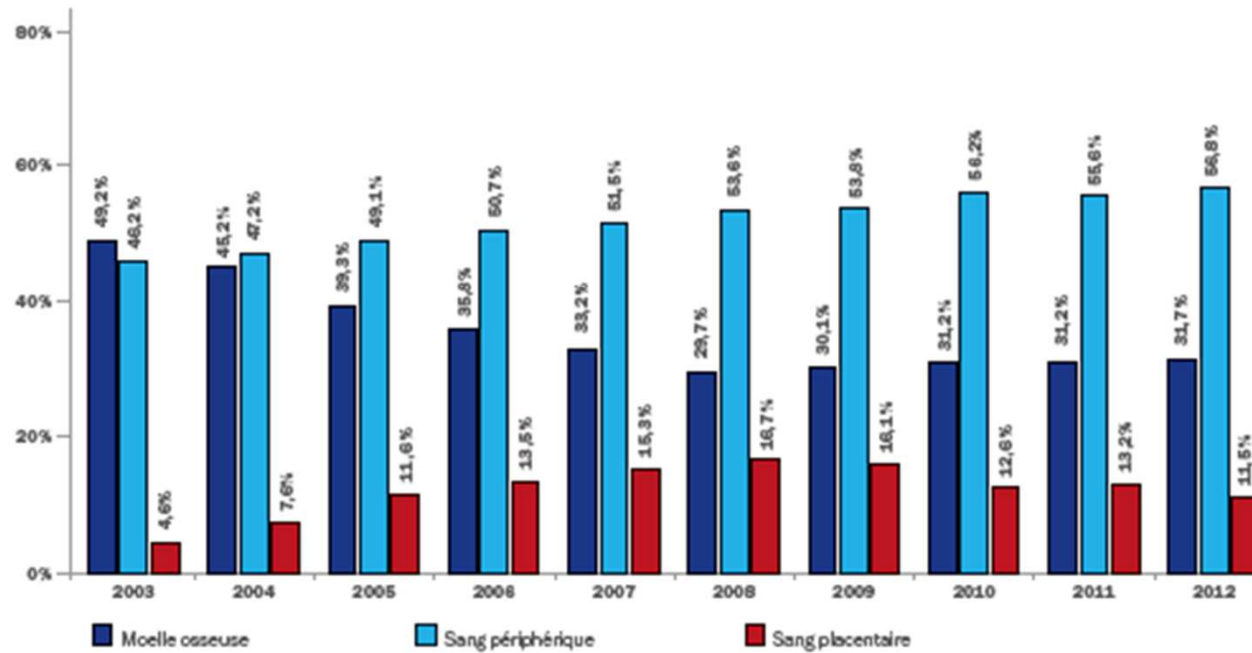
| | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Nombre de greffes autologues | 3091 | 3093 | 3095 | 3176 | 3121 | 2949 | 2860 | 2951 | 2675 | 3047 | 3003 |
| Nombre de greffes allogéniques | 855 | 932 | 973 | 982 | 1205 | 1252 | 1379 | 1472 | 1538 | 1671 | 1769 |
| <i>Dont greffes non apparentées</i> | 227 | 275 | 308 | 311 | 513 | 623 | 765 | 841 | 901 | 948 | 1021 |
| Nombre total de greffes | 3946 | 4025 | 4068 | 4158 | 4326 | 4201 | 4239 | 4423 | 4213 | 4718 | 4772 |

x 2 en 10 ans

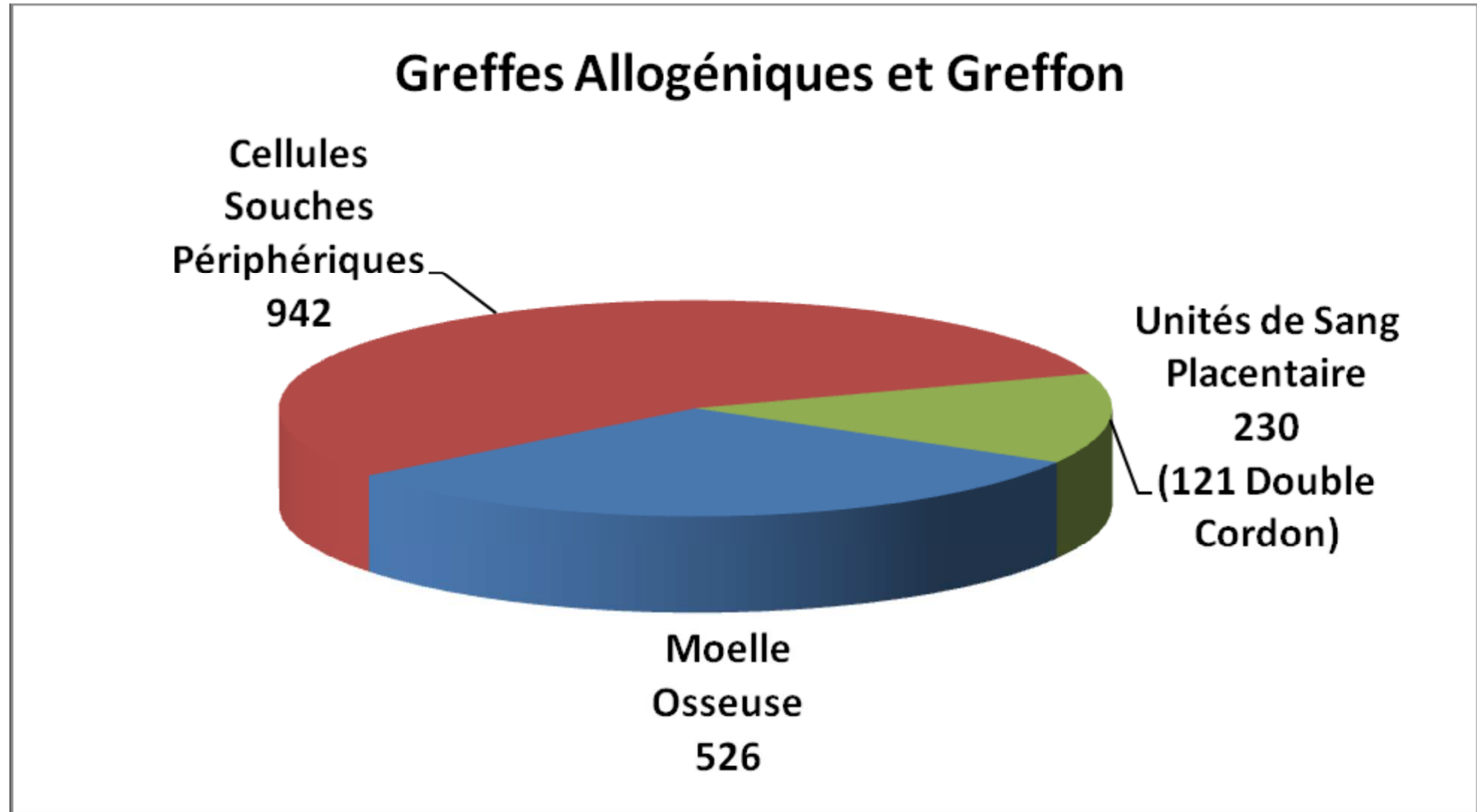


Mise à jour 2012

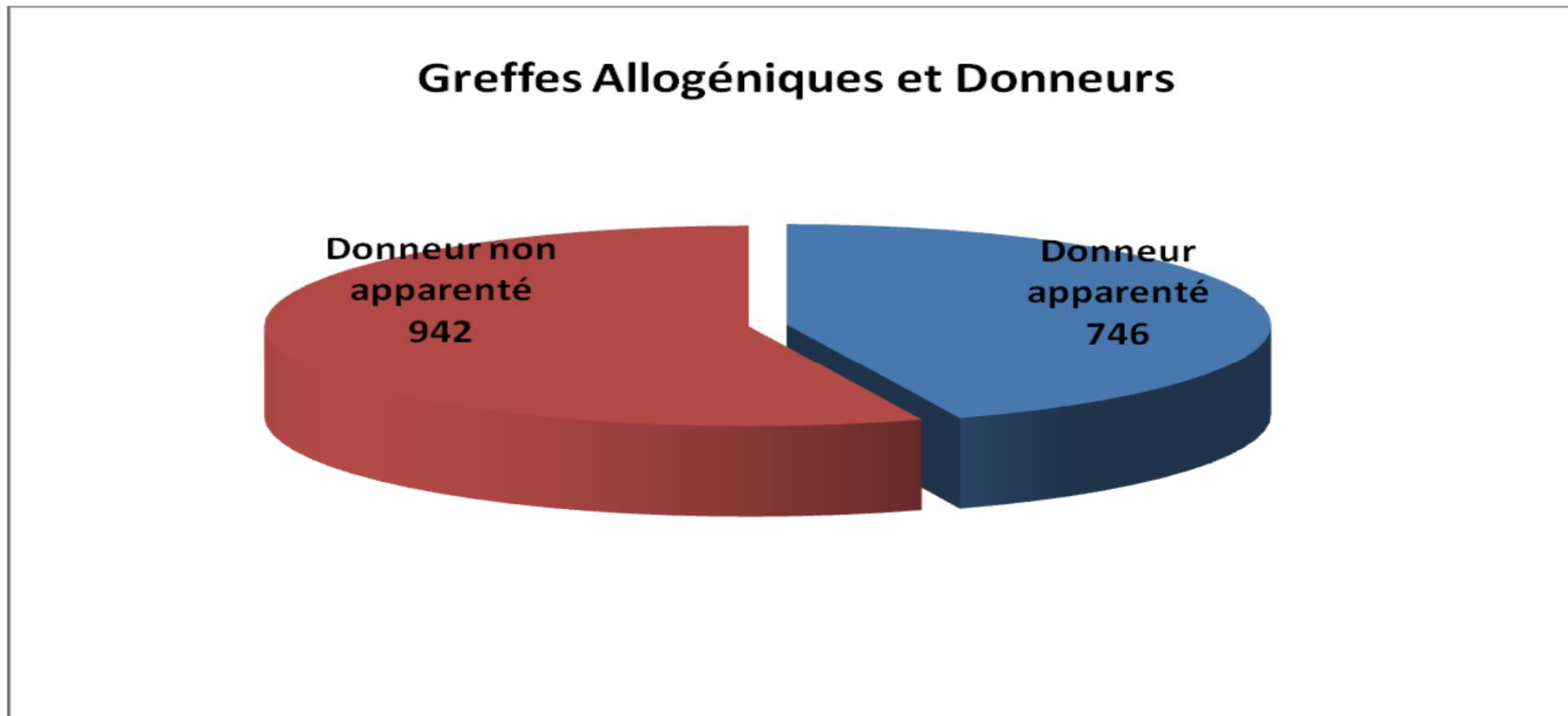
ÉVOLUTION DE LA RÉPARTITION DES SOURCES DE GREFFONS DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOIÉTIQUES ALLOGÉNIQUES



Greffes de CSH en 2011



Greffes CSH en 2011



58% des greffes sont réalisées à partir de donneurs non apparentés.

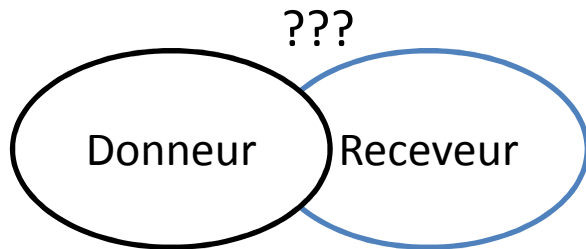
Greffes de CSH

- On estime entre 30 et 35% le risque de rechute après allogreffe
- Pic de survenue de la rechute entre 3 mois et 1 an
- 82% des patients n'ayant pas rechuté 2 ans après allogreffe sont toujours en RC à 9 ans

Chimérisme

- Chimère: animal mythologique

Etude du chimérisme:
déterminer l'origine des cellules
hématopoïétiques après l'allogreffe



Etude du chimérisme

- Analyse post greffe au niveau du sang périphérique ou de la moelle osseuse de marqueurs informatifs permettant de différencier la part donneur de la part receveur
 - Suivi de la prise de greffe
 - Détection de la rechute

- Non seulement identifier les cellules du receveur
 - Mais important de quantifier % donneur/receveur
 - Important de le suivre pour évaluer la réponse au traitement

Chimère complète (total donneur), chimère mixte

Etude du chimérisme

- Utiliser des marqueurs génétiques qui différencient le receveur avant allogreffe de son donneur
- Marqueurs lié au sexe
 - Mais uniquement si sexe différents
- Groupage sanguin : latence d'apparition

Etude du chimérisme

- Utiliser des marqueurs génétiques qui différencient le receveur avant allogreffe de son donneur
- Autres marqueurs : STR et SNP

ETUDE DU CHIMERISME

- Deux techniques STR et SNP
 - STR : short tandem of repeats ou microsatellites
 - SNP : single nucleotide polymorphism

Short Tandem of Repeats

- STR :short tandem of repeats ou microsatellites
(répartis sur tout le génome)

– Répétition de 2 à 10 fois d'un

- di nucléotide (CTCTCTCTCTCT...) ou
- trinuécléotide (CTGCTGCTGCTGCTGCTG...) ou
- tétranuécléotide (GATAGATAGATAGATAGATA.....)

polymorphisme de taille=
nombre variable de répétition suivant les individus

Short Tandem of Repeats

- polymorphisme de taille = variation du nombre de répétition suivant les individus

Par exemple sur un locus

Individu 1:

GATAGATAGATAGATAGATA.....(n).....GATAGATAGATA

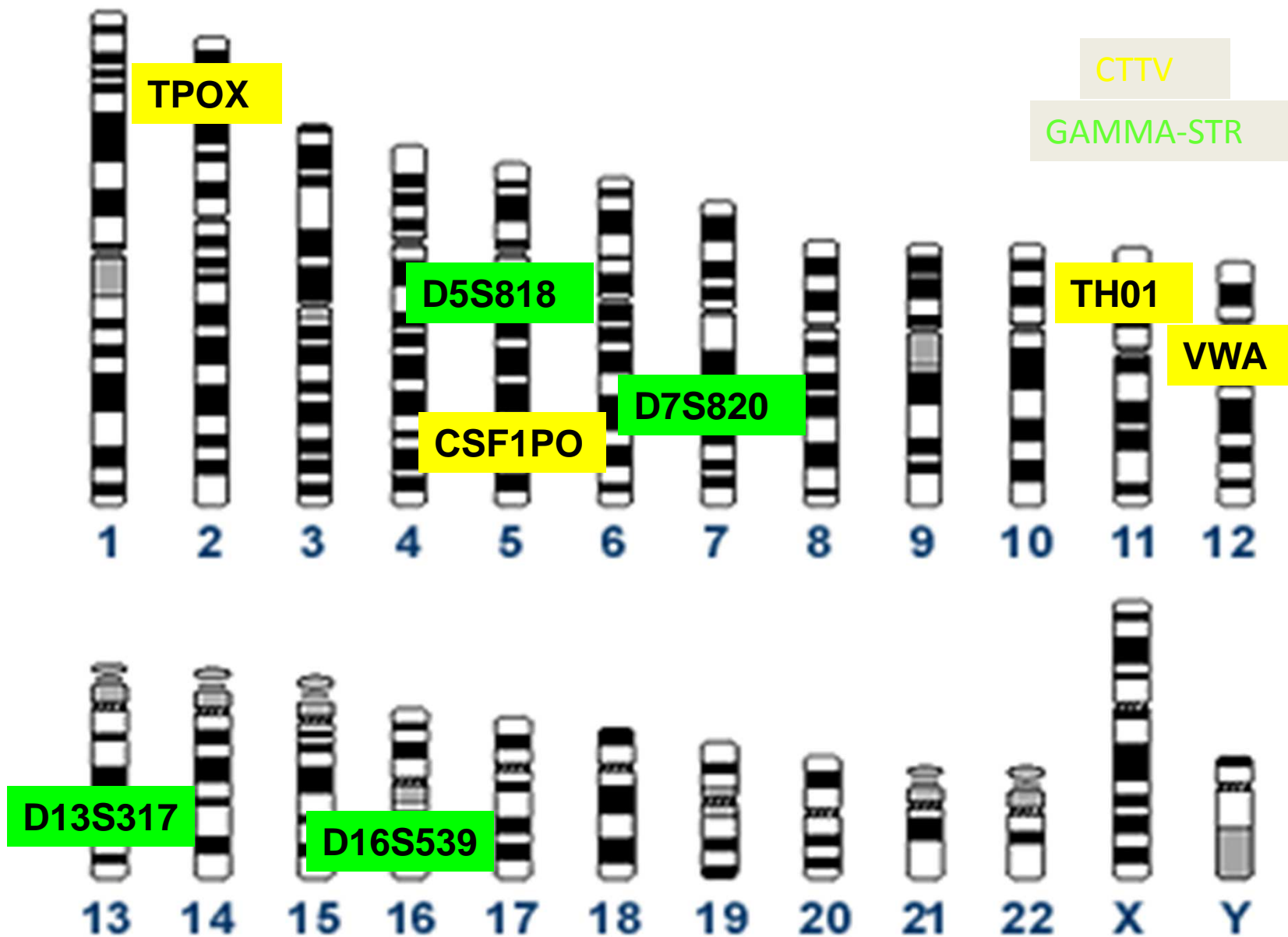
Individu 2:

GATAGATAGATAGATAGATA...(n-x)...GATAGATAGATA

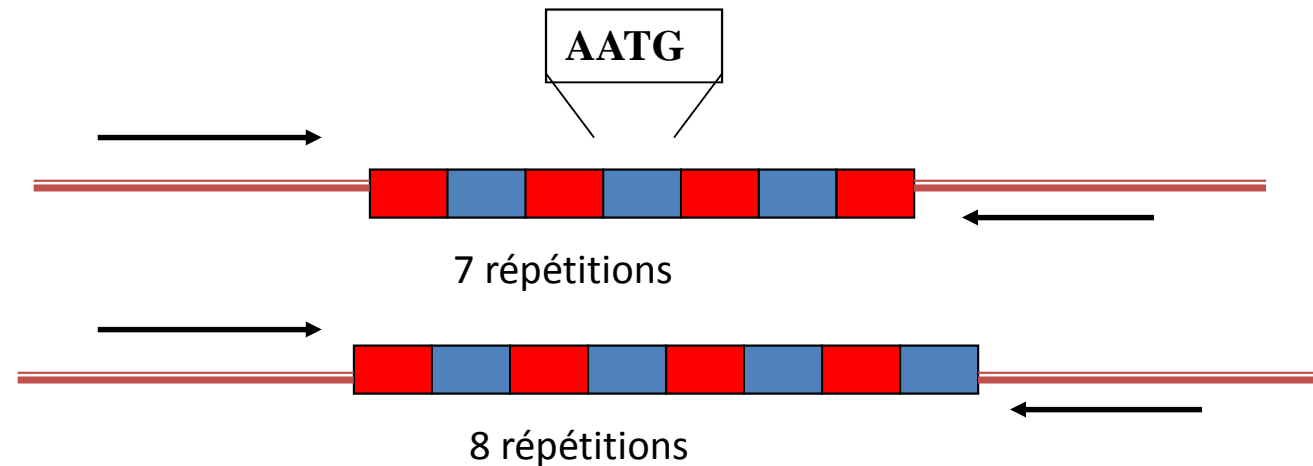
Chaque individu est caractérisé par le nombre de répétition sur chaque locus, 1 STR (par allèle) hérité de chacun de ses parents

Short Tandem of Repeats

- Dizaines de milliers de STR sur le génome
- Régions non codantes
- Rôle non connu
- Plusieurs allèles décrits par locus



Short Tandem of Repeats (STR)



- Régions répétitives variables

Homozygotes= allèle de même taille pour un système de STR

Hétérozygote= 2 allèles de taille différente pour un système de STR

Short Tandem of Repeats

- Réalisation d'une PCR autour des tandems avec une amorce fluorescente

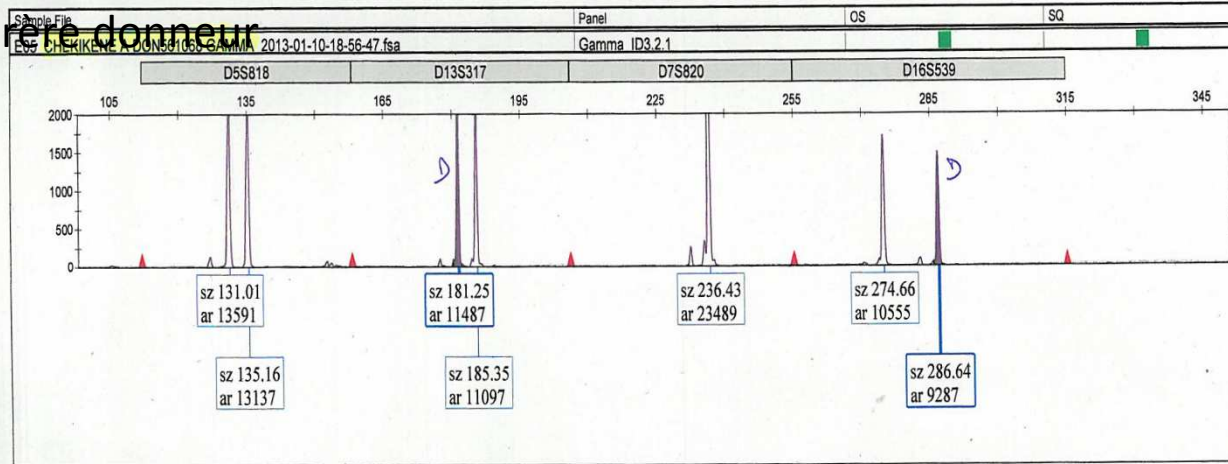
(Les couples d'amorces contiennent les amorces 5' et 3' qui encadrent les séquences répétitives à amplifier. Une des amorces de chacun des couples utilisés est marquée en 5' par un fluorochrome (la fluorésceine).

- Migration électrophorétique sur séquenceur

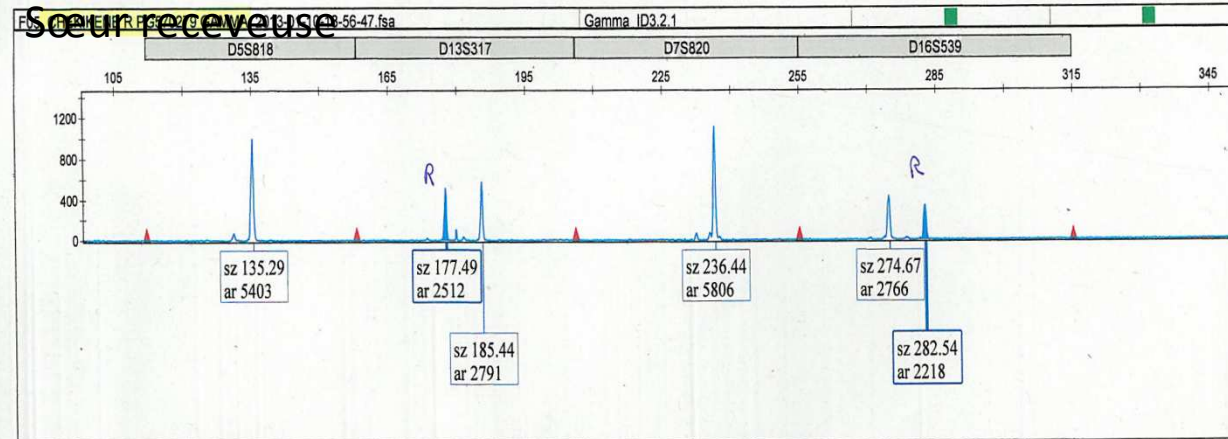
→ séparation des STR en fonction de la taille et la fluorescence

Signal fluorescent proportionnel au nombre de cellules (semi-quantitatif)

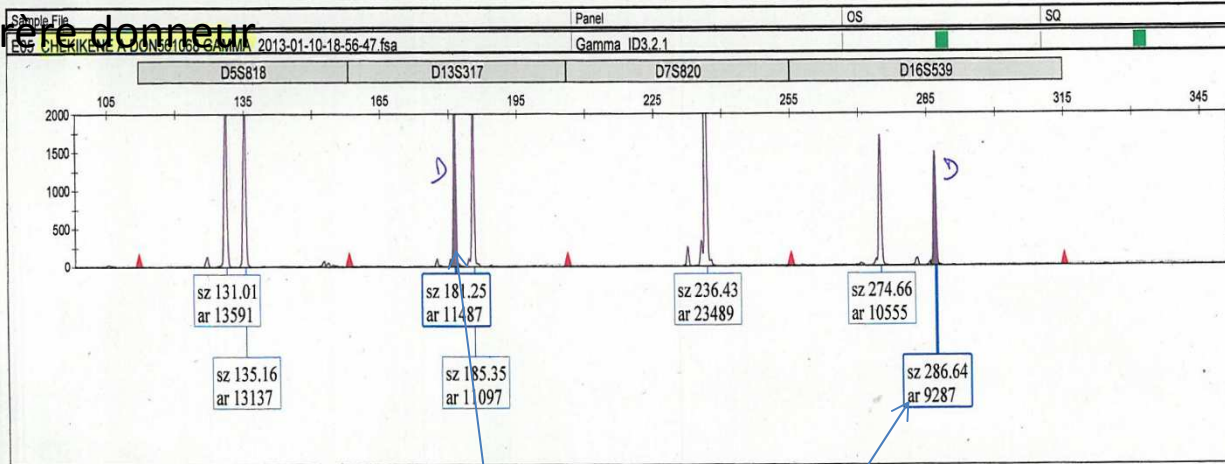
Frère donneur



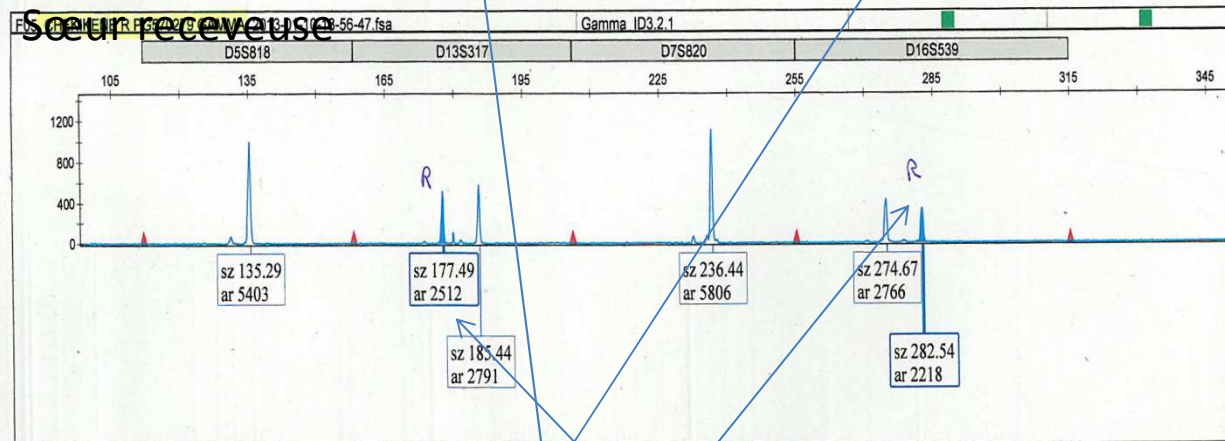
Sœur receveuse



Frère donneur



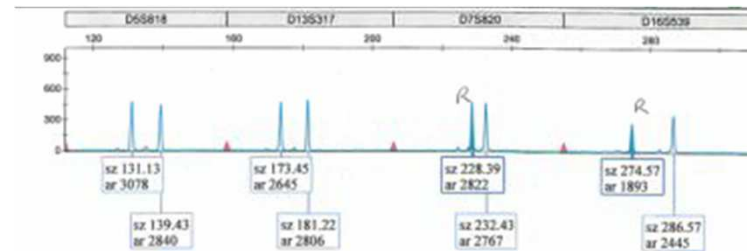
Sœur receveuse



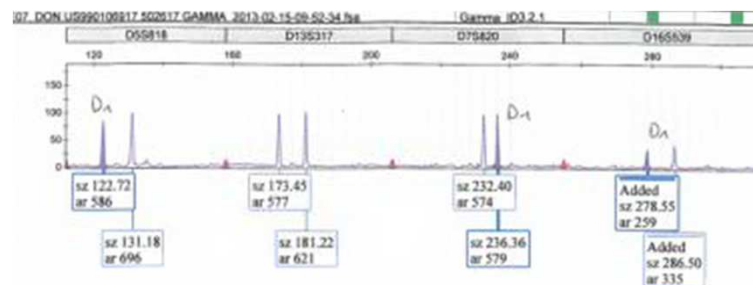
Etablissement profil D et R

Cas des doubles greffes USP

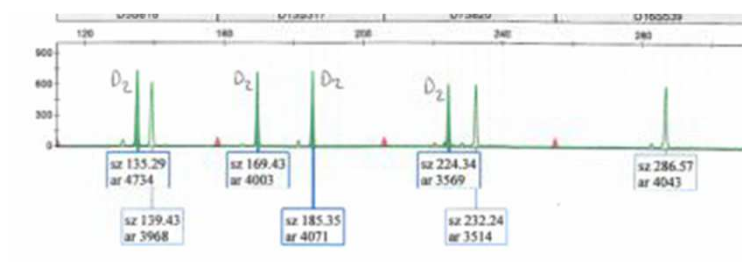
- Etablissement profil receveur

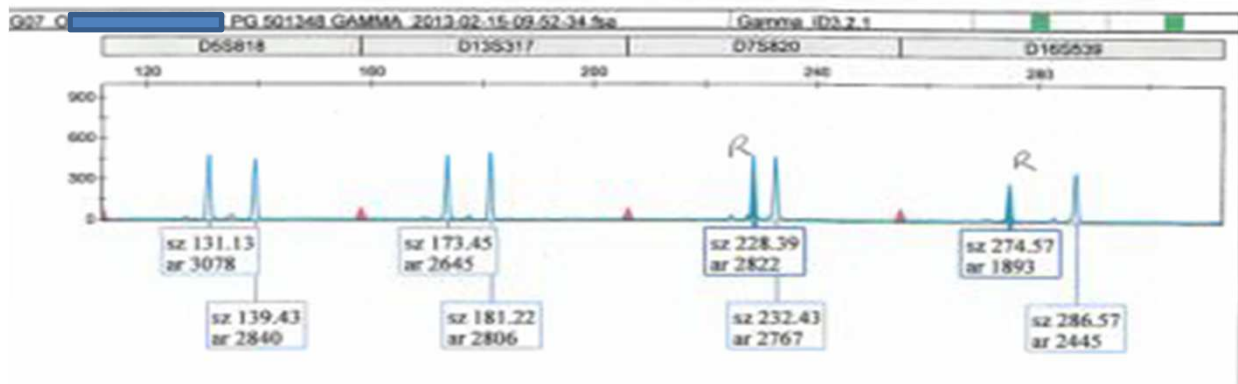
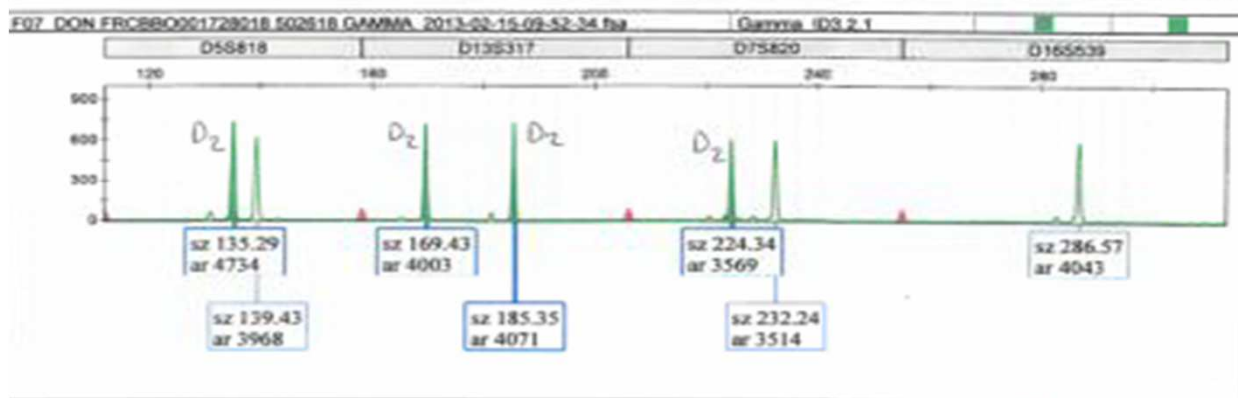
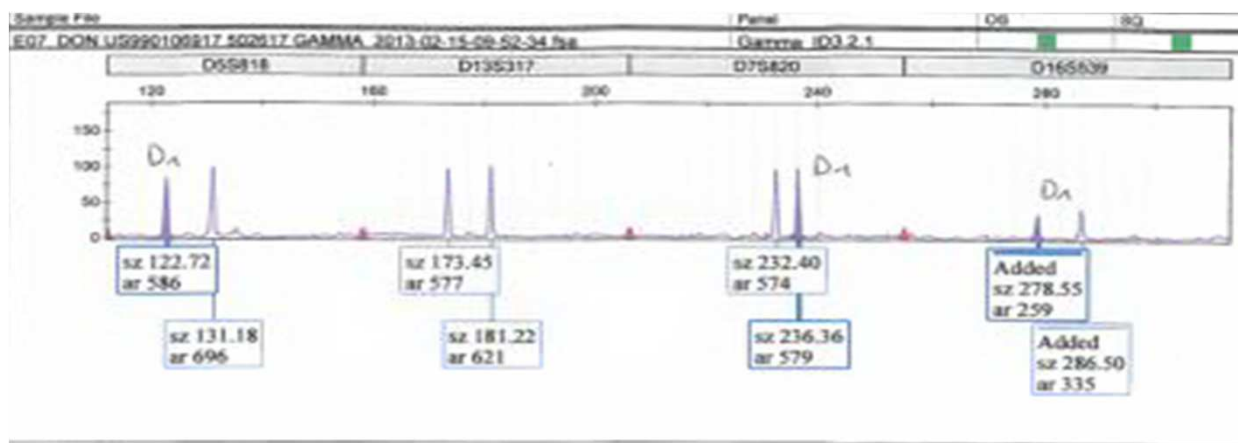


- Etablissement profil donneur USP1



- Etablissement profil donneur USP 2





Chimérisme STR

- Calcul % donneur = ADN donneur/ADN total
- Utilisation aire sous la courbe (fluorescence proportionnelle à quantité cellules et ADN)

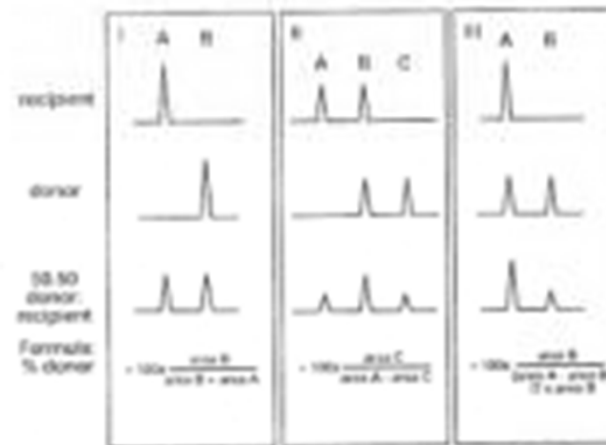


Figure 1 Schematic illustration of calculations performed for the quantitative assessment of mixed chimerism. I. Calculation in alleles for which both donor and recipient have distinct peaks. II. Calculation in the situation of two heterozygous alleles, with one allele shared. III. Calculation of

Chimérisme STR

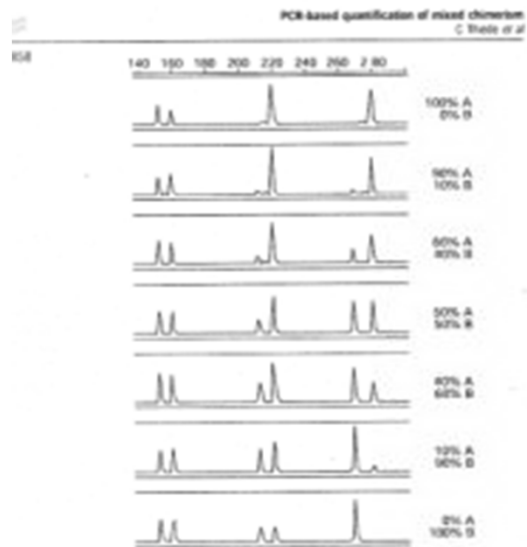


Figure 2. Electropherograms obtained from cell dilution samples. The alleles shown are D19S11, D1S2311, D7S828 labeled with the fluorophore NED. The actual cell mixtures are shown in each lane.

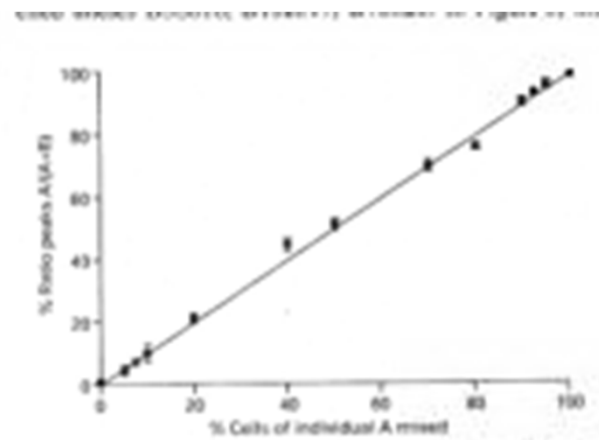


Figure 3. *In vitro* testing of STR-PCR for quantitation of mixed chimerism. Representative experiment showing the correlation between cell mixture and the ratio of peak areas derived from each component. The data points

Limites de la technique

- **Compétition** pour l'amplification lorsque le % ADN receveur est faible : risque de faux négatif
 - 1 seul puit réactionnel pour les marqueurs donneur et receveur
 - Même marqueur informatif pour le donneur et le receveur
- Phénomène de **stutter** qui masque les faibles pourcentages
- Sensibilité 3 à 5%
- Phénomène de **plateau** en fin d'amplification, témoin de la perte d'efficacité après un certain nombre de cycles

ETUDE DU CHIMERISME

- Deux techniques STR et SNP
 - STR : short tandem of repeats ou microsatellites
 - SNP : single nucleotide polymorphism

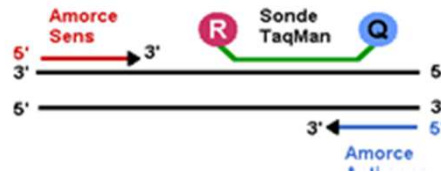
Single Nucleotide Polymorphism

- SNP: Variation à l'échelle du nucléotide
- mutation ponctuelle = remplacement d'une base par une autre
- Une base à l'état hétérozygote tous les 200 à 1000 nucléotides.
 - CTCACTCCTG**A**GGAGAAG
 - CTCACTCCTG**T**GGAGAAG

↑
SNP

Single Nucleotide Polymorphism

- Technique PCR en temps réel



Hybridation sonde spécifique du SNP sur brin ADN

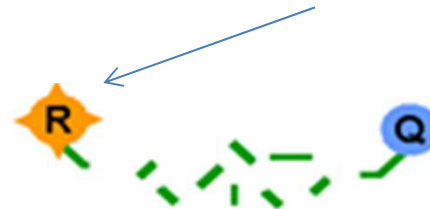
Sonde TaqMan

- Sonde liée à 2 marqueurs fluorescents : le reporter et le quencher

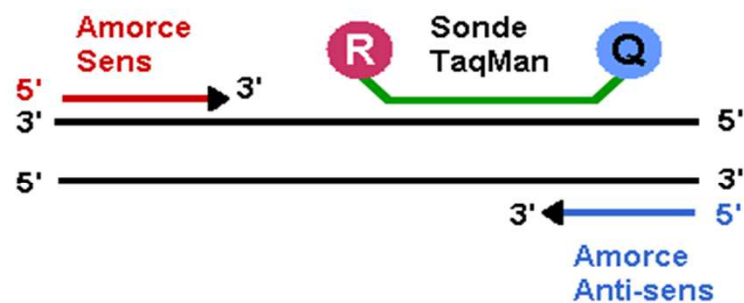
- Si les 2 marqueurs sont attachés : aucune émission fluorescente



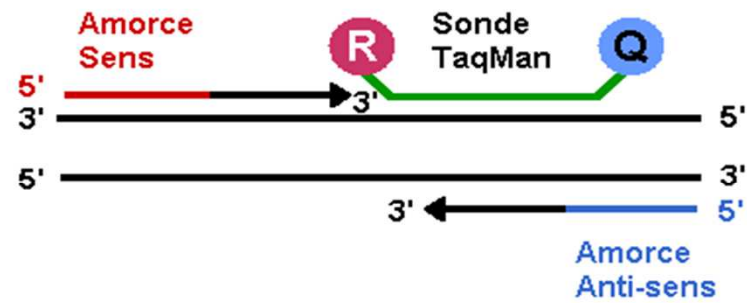
- Si le reporter est clivé : émission de fluorescence



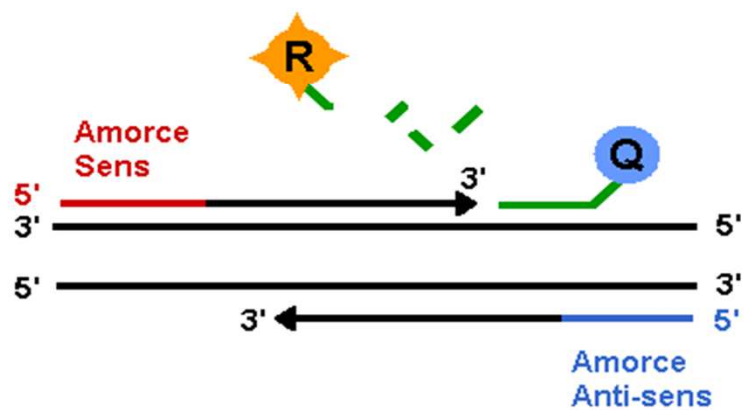
1 Hybridation



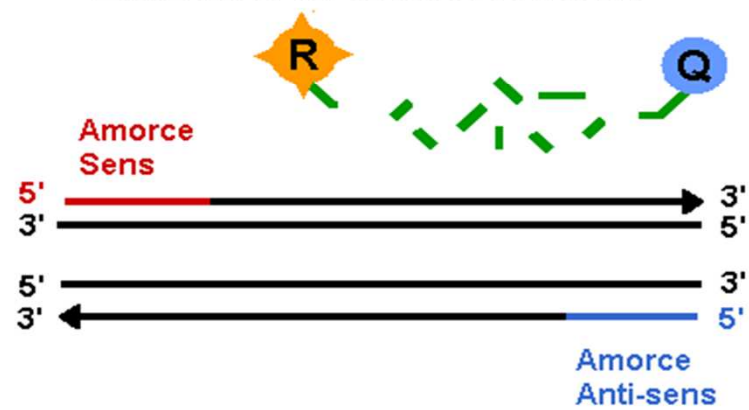
2 Elongation

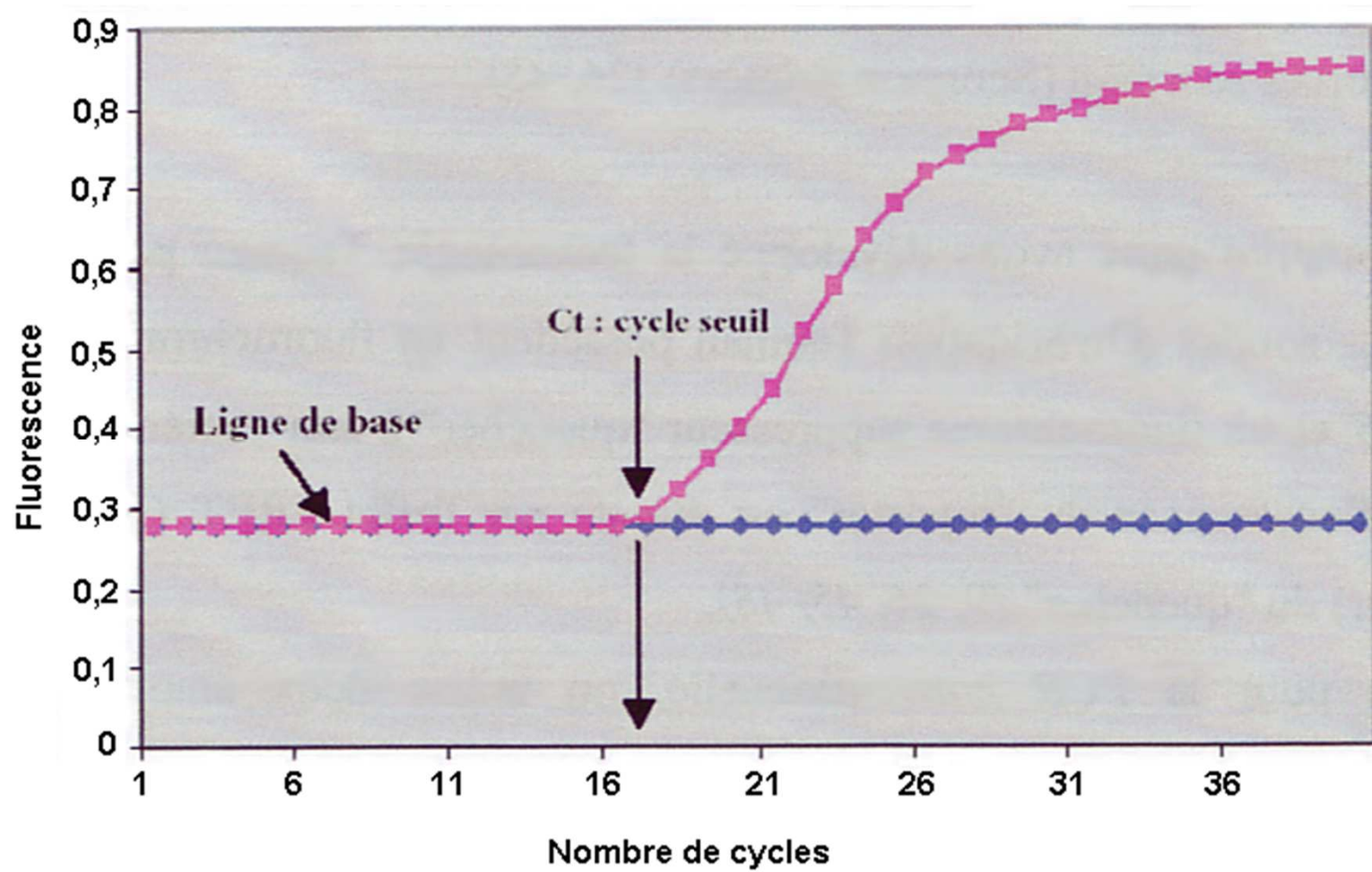


3 Clivage de la sonde Libération de la fluorescence

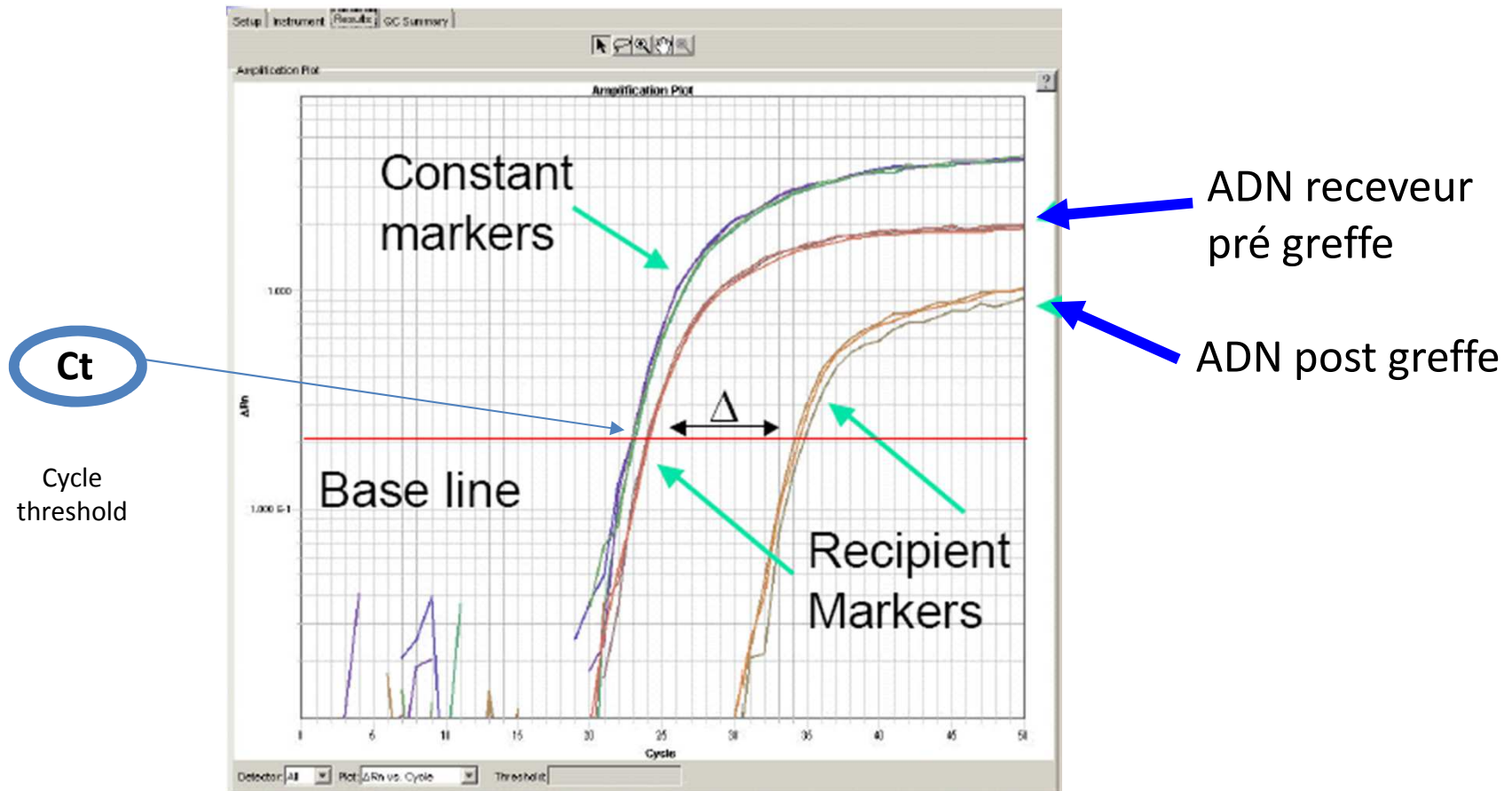


4 Fin de l'élongation Emission de la fluorescence

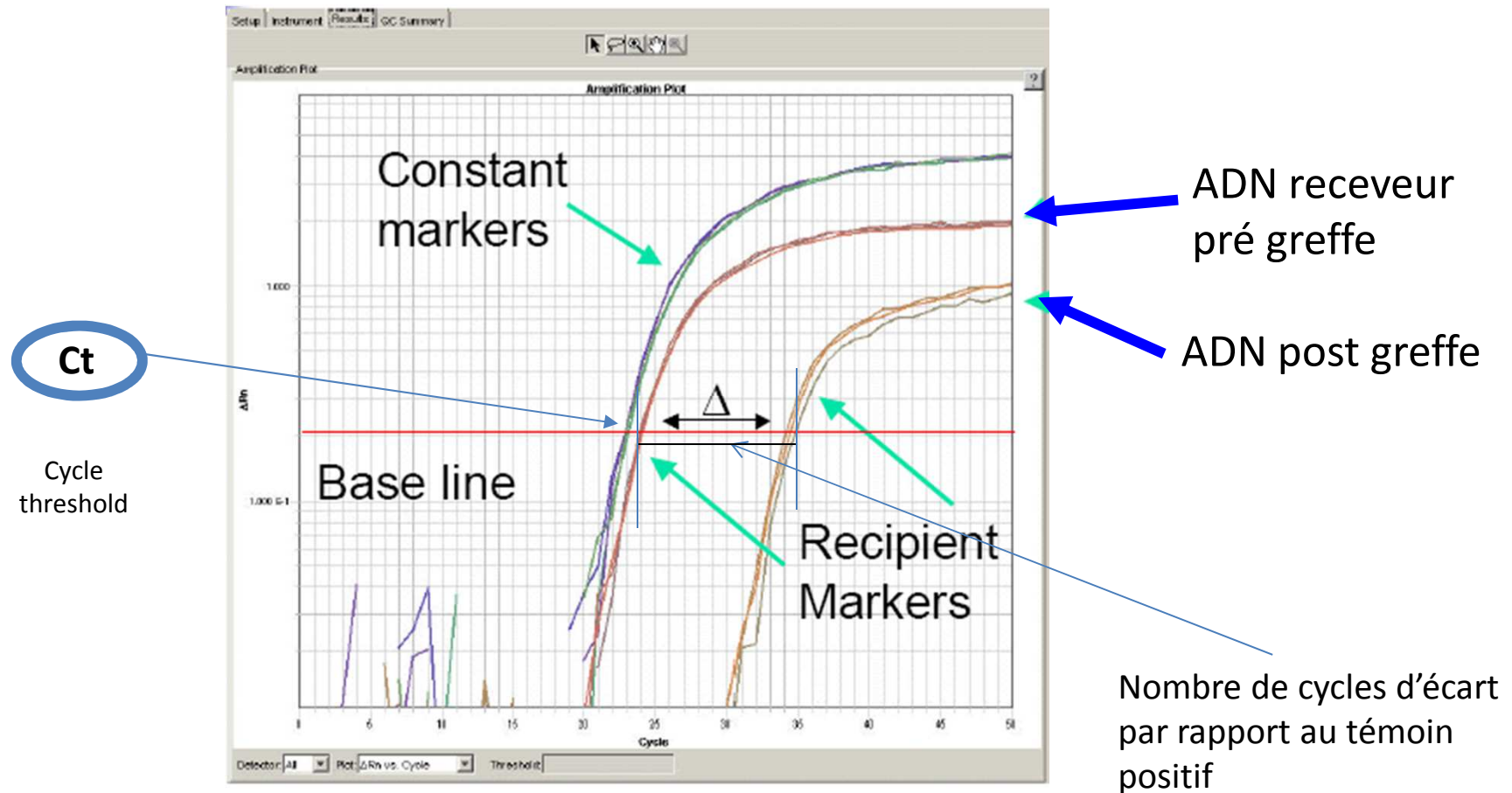




INTERPRETATION

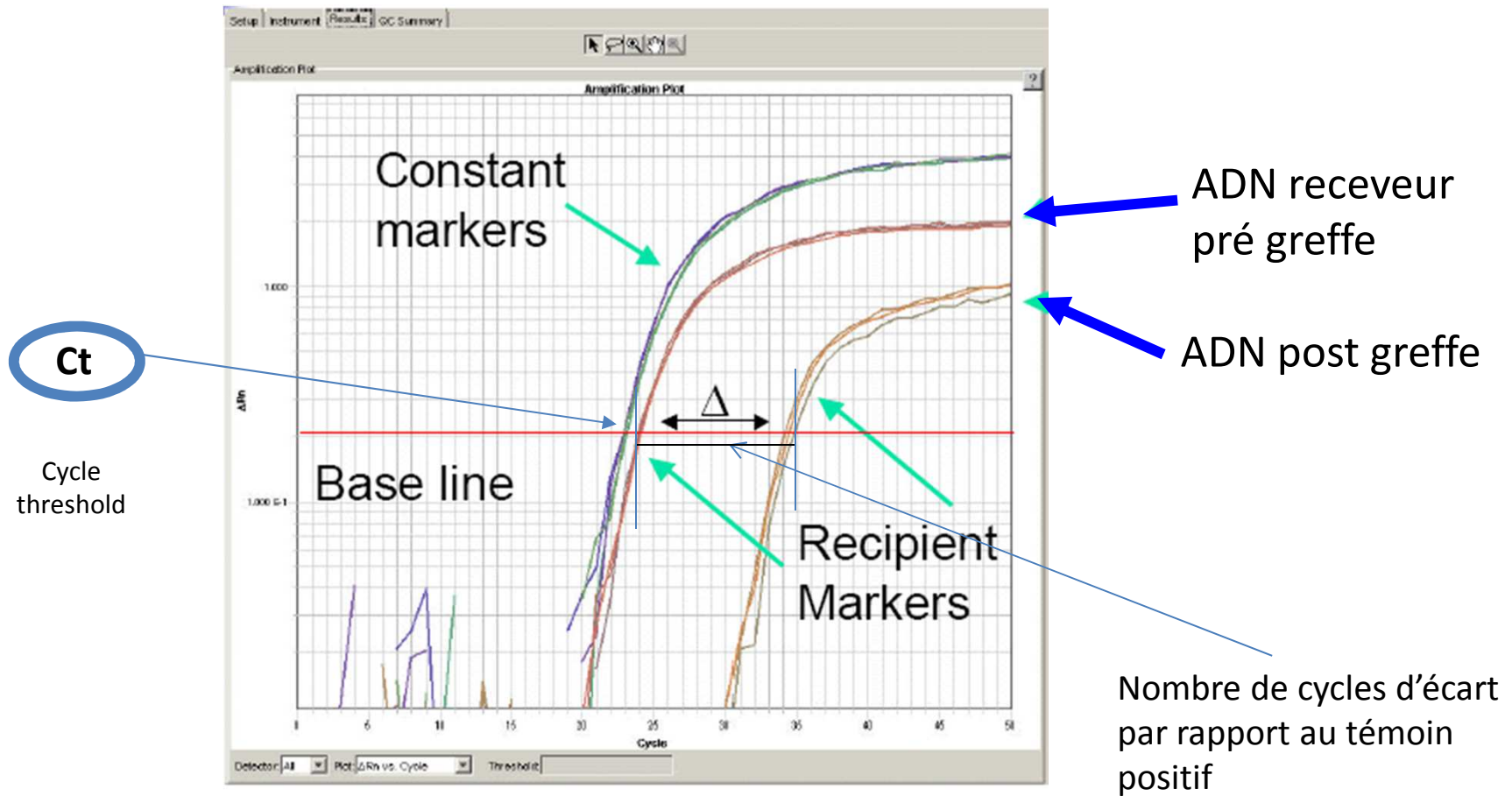


INTERPRETATION



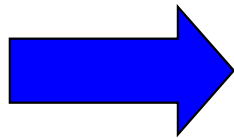
- A chaque cycle de PCR, on augmente d'un facteur 2 la quantité d'ADN
- Donc, inversement, à chaque cycle d'écart, la quantité d'ADN est divisée par 2
 - à un cycle : 50%
 - à 2 cycles : 25%
 - à 3 cycles : 12,5%
 -
 - à 12 cycles : 0% ADN

INTERPRETATION



INFORMATIVITE

- Polymorphismes de type SNP
- 31 marqueurs
- 19 locus différents
- 14 chromosomes



INFORMATIF

dans > 95% couples testés

Détermination marqueurs

| Assay name | Assessment | DON 595078 | PG 595075 | Result |
|------------|-------------|------------|-----------|----------------------------|
| CA001 | 8 | + | + | Not informative |
| CA002 | 14 | - | - | Not informative |
| CA003 | 18 | - | - | Not informative |
| CA004 | 18 | + | + | Not informative |
| CA005 | 13 | - | - | Not informative |
| CA006 | 1 | + | + | Not informative |
| CA007 | 3 | - | - | Not informative |
| CA008 | 7 | - | + | Informative for PG 595075 |
| CA009 | 17 | - | - | Not informative |
| CA010 | 5 | - | + | Informative for PG 595075 |
| CA011 | X | + | + | Not informative |
| CA012 | X | - | - | Not informative |
| CA013 | 6 | + | + | Not informative |
| CA014 | 12 | + | + | Not informative |
| CA015 | 5 | + | + | Not informative |
| CA016 | 07 | + | + | Not informative |
| CA017 | Y | - | + | Informative for PG 595075 |
| CA018 | 11 | - | - | Not informative |
| CA019 | 20 | + | - | Informative for DON 595078 |
| CA020 | 1 | + | + | Not informative |
| CA021 | 4 | + | - | Informative for DON 595078 |
| CA022 | 10 | + | + | Not informative |
| CA023 | 11 | + | + | Not informative |
| CA024 | 3 | + | + | Not informative |
| CA025 | 5 | + | + | Not informative |
| CA026 | 16 | - | - | Not informative |
| CA027 | 6 | - | - | Not informative |
| CA028 | 20 | + | + | Not informative |
| CA029 | 2 | + | + | Not informative |
| CA030 | 9 | + | + | Not informative |
| CA031 | 11 | + | + | Not informative |
| CA032 | 6 | + | - | Informative for DON 595078 |
| CA033 | 12 | + | + | Not informative |
| CA034 | 1 | + | - | Informative for DON 595078 |
| CA999 | Amp Control | + | + | Pass/Pass |
| CA999 | NTC | - | - | Pass/Pass |

| Quality Measurements | DON 595078 | PG 595075 | Warnings |
|----------------------|------------|-----------|----------|
| Amp Control: | Pass | Pass | |
| NTC: | Pass | Pass | |
| Atypical Count: | 0 | 0 | |

Détermination marqueurs

Informative Markers for DON 595078

| Marker: | Chromosome: |
|---------|-------------|
| CA019 | 20 |
| CA021 | 4 |
| CA032 | 6 |
| CA034 | 1 |

Quality Measurements

| | |
|-----------------|------|
| Amp Control: | Pass |
| NTC: | Pass |
| Atypical Count: | 0 |

Informative Markers for PG 595075

| Marker: | Chromosome: |
|---------|-------------|
| CA008 | 7 |
| CA010 | 5 |
| CA017 | Y |

Quality Measurements

| | |
|-----------------|------|
| Amp Control: | Pass |
| NTC: | Pass |
| Atypical Count: | 0 |

Analyse sang et moelle

- Receveur pré greffe
- Prélèvement antérieur
- A tester
- A tester
- Lignée contrôle

| all | Sample | Assay | Start | End | Ct | Mean Ct | Ct Std Dev | DD Ct | Mean FC | Outlier |
|-----|-----------------|-------|-------|-----|---------|---------|------------|---------|----------|---------|
| 1 | PG 593052 | CA999 | 3 | 15 | 23.4073 | 23.4363 | 0.0596 | | | No |
| 2 | PG 593052 | CA999 | 3 | 15 | 23.3958 | 23.4363 | 0.0596 | | | No |
| 3 | PG 593052 | CA999 | 3 | 15 | 23.5048 | 23.4363 | 0.0596 | | | No |
| 4 | PG 593052 | CA014 | 3 | 15 | 24.4595 | 24.4227 | 0.0759 | | | No |
| 5 | PG 593052 | CA014 | 3 | 15 | 24.3354 | 24.4227 | 0.0759 | | | No |
| 6 | PG 593052 | CA014 | 3 | 15 | 24.4732 | 24.4227 | 0.0759 | | | No |
| 7 | PG 593052 | CA030 | 3 | 15 | 25.3327 | 25.3682 | 0.0942 | | | No |
| 8 | PG 593052 | CA030 | 3 | 15 | 25.2969 | 25.3682 | 0.0942 | | | No |
| 9 | PG 593052 | CA030 | 3 | 15 | 25.4749 | 25.3682 | 0.0942 | | | No |
| 10 | ANT 598533 0.7% | CA999 | 3 | 15 | 23.4093 | 23.3288 | 0.1028 | | | No |
| 11 | ANT 598533 0.7% | CA999 | 3 | 15 | 23.3642 | 23.3288 | 0.1028 | | | No |
| 12 | ANT 598533 0.7% | CA999 | 3 | 15 | 23.2130 | 23.3288 | 0.1028 | | | No |
| 13 | ANT 598533 0.7% | CA014 | 3 | 15 | 31.3136 | 31.3382 | 0.0551 | 7.0230 | 0.7689 | No |
| 14 | ANT 598533 0.7% | CA014 | 3 | 15 | 31.2996 | 31.3382 | 0.0551 | 7.0230 | 0.7689 | No |
| 15 | ANT 598533 0.7% | CA014 | 3 | 15 | 31.4013 | 31.3382 | 0.0551 | 7.0230 | 0.7689 | No |
| 16 | ANT 598533 0.7% | CA030 | 3 | 15 | 32.5760 | 32.4459 | 0.1548 | 7.1852 | 0.6871 | No |
| 17 | ANT 598533 0.7% | CA030 | 3 | 15 | 32.4871 | 32.4459 | 0.1548 | 7.1852 | 0.6871 | No |
| 18 | ANT 598533 0.7% | CA030 | 3 | 15 | 32.2747 | 32.4459 | 0.1548 | 7.1852 | 0.6871 | No |
| 19 | ST 600069 | CA999 | 3 | 15 | 23.8217 | 23.7632 | 0.0625 | | | No |
| 20 | ST 600069 | CA999 | 3 | 15 | 23.6973 | 23.7632 | 0.0625 | | | No |
| 21 | ST 600069 | CA999 | 3 | 15 | 23.7706 | 23.7632 | 0.0625 | | | No |
| 22 | ST 600069 | CA014 | 3 | 15 | 40.0000 | 39.7084 | 0.5051 | 14.9588 | 0.0031 | No |
| 23 | ST 600069 | CA014 | 3 | 15 | 40.0000 | 39.7084 | 0.5051 | 14.9588 | 0.0031 | No |
| 24 | ST 600069 | CA014 | 3 | 15 | 39.1251 | 39.7084 | 0.5051 | 14.9588 | 0.0031 | No |
| 25 | ST 600069 | CA030 | 3 | 15 | 40.0000 | 40.0000 | 0.0000 | 14.3049 | 0.0049 | No |
| 26 | ST 600069 | CA030 | 3 | 15 | 40.0000 | 40.0000 | 0.0000 | 14.3049 | 0.0049 | No |
| 27 | ST 600069 | CA030 | 3 | 15 | 40.0000 | 40.0000 | 0.0000 | 14.3049 | 0.0049 | No |
| 28 | MO 600071 | CA999 | 3 | 15 | 23.0326 | 23.0842 | 0.0454 | | | No |
| 29 | MO 600071 | CA999 | 3 | 15 | 23.1021 | 23.0842 | 0.0454 | | | No |
| 30 | MO 600071 | CA999 | 3 | 15 | 23.1179 | 23.0842 | 0.0454 | | | No |
| 31 | MO 600071 | CA014 | 3 | 15 | 31.8263 | 31.7278 | 0.0854 | 7.6572 | 0.4954 | No |
| 32 | MO 600071 | CA014 | 3 | 15 | 31.8745 | 31.7278 | 0.0854 | 7.6572 | 0.4954 | No |
| 33 | MO 600071 | CA014 | 3 | 15 | 31.6826 | 31.7278 | 0.0854 | 7.6572 | 0.4954 | No |
| 34 | MO 600071 | CA030 | 3 | 15 | 32.2230 | 32.2491 | 0.0825 | 7.2330 | 0.6647 | No |
| 35 | MO 600071 | CA030 | 3 | 15 | 32.1828 | 32.2491 | 0.0825 | 7.2330 | 0.6647 | No |
| 36 | MO 600071 | CA030 | 3 | 15 | 32.3414 | 32.2491 | 0.0825 | 7.2330 | 0.6647 | No |
| 37 | CTL EBV 9025 | CA999 | 3 | 15 | 22.9306 | 23.0643 | 0.1193 | | | No |
| 38 | CTL EBV 9025 | CA999 | 3 | 15 | 23.1022 | 23.0643 | 0.1193 | | | No |
| 39 | CTL EBV 9025 | CA999 | 3 | 15 | 23.1600 | 23.0643 | 0.1193 | | | No |
| 40 | CTL EBV 9025 | CA014 | 3 | 15 | 24.8273 | 24.7207 | 0.1957 | 0.8700 | 62.8507 | No |
| 41 | CTL EBV 9025 | CA014 | 3 | 15 | 24.8400 | 24.7207 | 0.1957 | 0.8700 | 62.8507 | No |
| 42 | CTL EBV 9025 | CA014 | 3 | 15 | 24.4949 | 24.7207 | 0.1957 | 0.8700 | 62.8507 | No |
| 43 | CTL EBV 9025 | CA030 | 3 | 15 | 24.8675 | 24.9684 | 0.0996 | -0.0278 | 101.9456 | No |
| 44 | CTL EBV 9025 | CA030 | 3 | 15 | 24.9712 | 24.9684 | 0.0996 | -0.0278 | 101.9456 | No |
| 45 | CTL EBV 9025 | CA030 | 3 | 15 | 25.0666 | 24.9684 | 0.0996 | -0.0278 | 101.9456 | No |

LIMITES DE LA TECHNIQUE

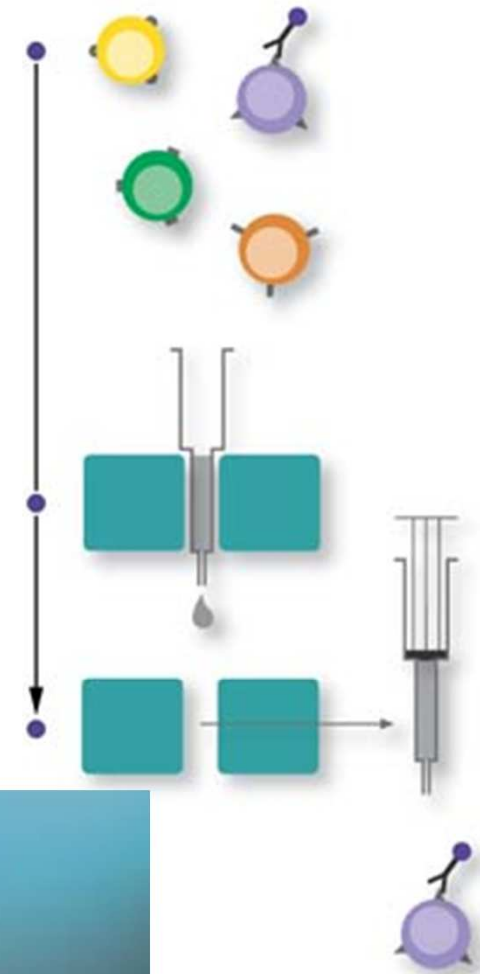
- Quantité ADN
- Non adapté aux séries
- 1 seul système étudié : micro contaminations de l'ADN liées à l'extraction peuvent perturber les résultats

SUIVI CLINIQUE

- **Un % isolé n'a pas de valeur clinique**
- Suivi longitudinal avec gradient entre 0 et 100%
- Intérêt d'avoir **plusieurs marqueurs informatifs**
- Intérêt de disposer d' une **technique sensible**
- Intérêt de travailler sur **populations cellulaires séparées**

TRI CELLULAIRE

- Méthode automatisée
- Séparation par sélection positive
- Utilisation de billes magnétiques
- Travail sur cellules mononucléées recueillies après ficoll ou sang total
- Avantages :
 - Très bonne pureté
 - Prise d'essai 1.3 ml
 - Adapté aux séries
 - Temps technicien court
- Inconvénients :
 - Coût



Populations cellulaires étudiées

| | SANG | MOELLE |
|------------|-------------|---------------|
| LAM | CD33 | CD34 |
| LMC | CD15 | |
| LLC | CD19 | |
| MM | | CD138 |

+ CD3 jusqu'à la conversion « total donneur »

En conclusion

- Le monitoring longitudinal du chimérisme fournit des indications pour :
 - **CONFIRMER** la prise de greffe, le rejet, la rechute
 - **ANTICIPER** précocement des changements de l'état clinique
 - **INTERVENIR** avant l'échec de greffe
 - **EVALUER** les effets du traitement

- Distinction pathologies malignes
 - Obtention d'une chimère totale donneur
 - Suivi de la rechute
- Pathologies non malignes: aplasie médullaire, hémoglobinopathies, déficits immunitaires, maladies métaboliques

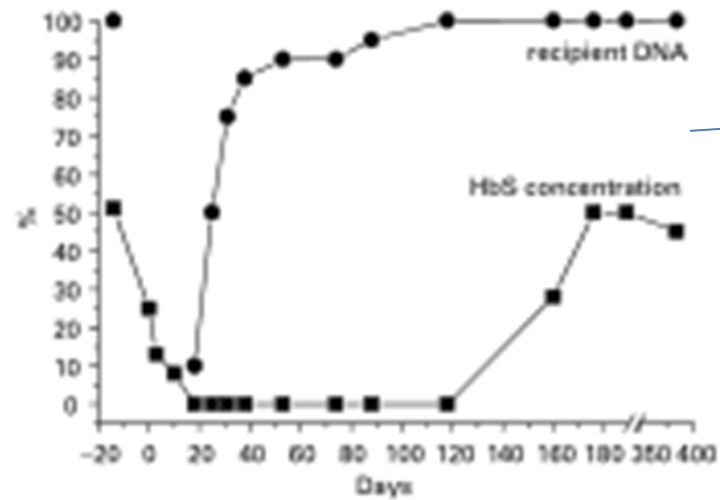
- Pathologies non malignes

- Amélioration de l'hématopoïèse
- Corriger les capacités immunologiques
- Augmenter ou normaliser les taux enzymatiques
- Avec chimiothérapie moins myélo-ablative

-> chimère mixte plus fréquente

-> Détection rejet greffon

- Exemple drépanocytose greffée, rejet greffon



→ Le chimérisme a 2 mois d'avance

- Pathologies malignes
 - Marqueurs moléculaires maladie résiduelle (MRD)
 - En l'absence de ces marqueurs, chimérisme peut être utilisé
 - Intérêt des sous populations

- Pathologies malignes
 - Suivi efficacité DLI
 - Alloréactivité, effet GVL
 - Adaptation traitement immunosuppresseur
 - Arrêt quand CD3 total donneur

En conclusion

- En pratique
 - Utilisation de la technique STR jusqu'à décroissance <5%
 - Puis technique SNP par la suite pour avoir un seuil de sensibilité à 0,2%
 - Contrôle STR si > 5%
 - Rendu de résultats rapide pour prise en charge clinique appropriée (non prise du greffon, rechute, post DLI, adaptation du traitement immunosuppresseur)