

# Journées TACT

## Suivi des patients greffés

Philippe Moskovtchenko



# HLA- Généralités

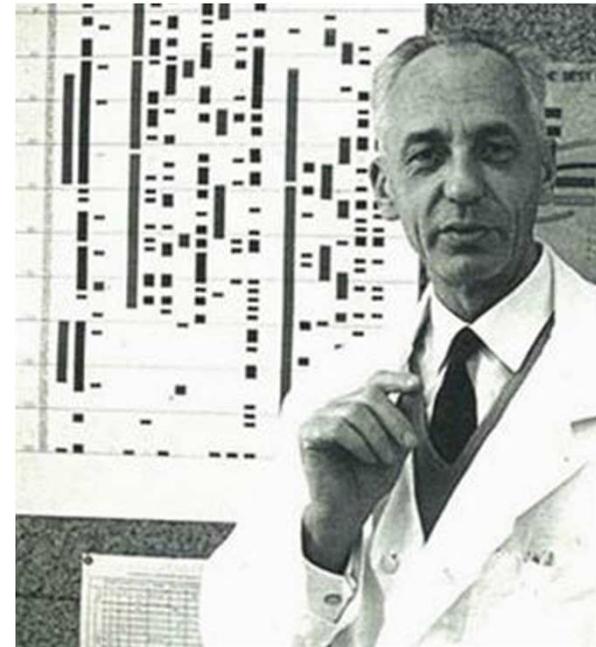
## Définitions

**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)

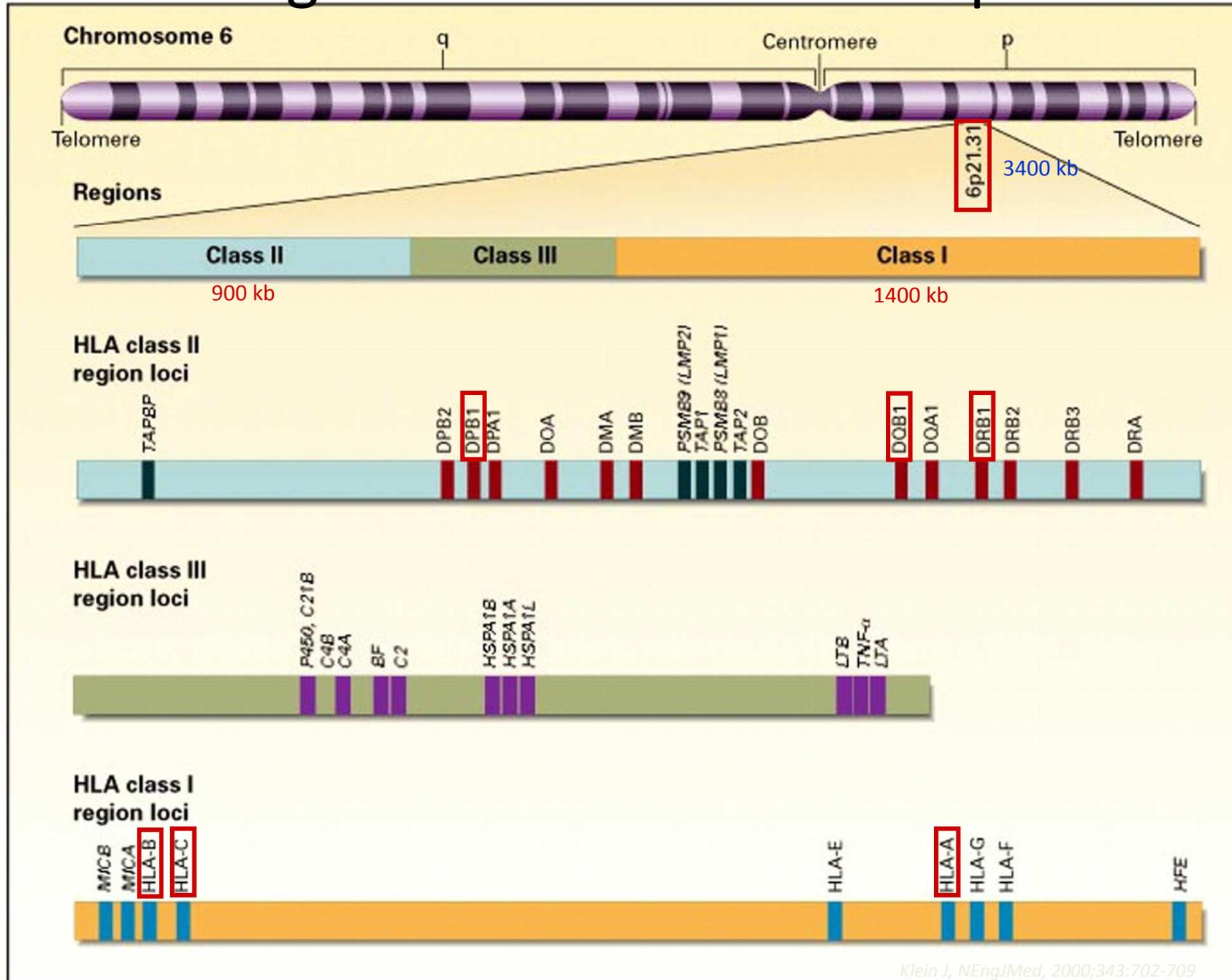
➔ Ag leucocytaires pouvant  
entraîner la synthèse d'Ac  
spécifiques



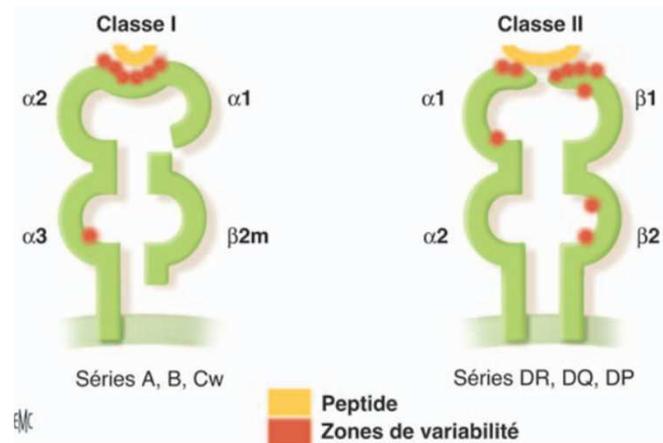
# HLA- Généralités

- 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



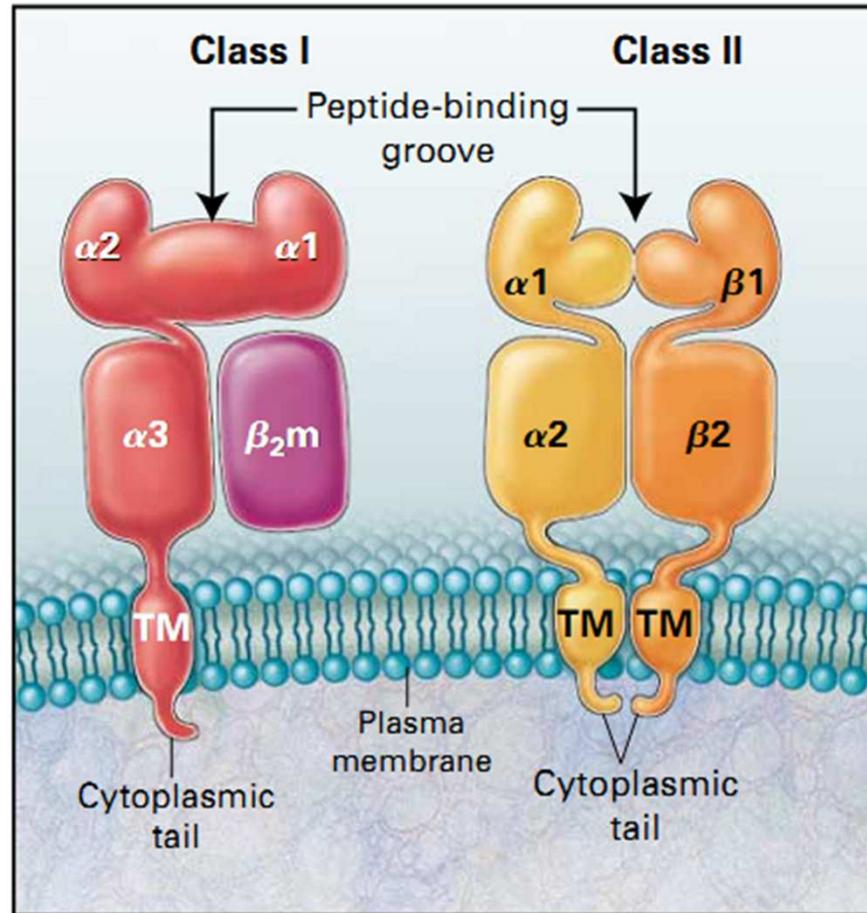
# Les molécules HLA



Molécules classe I : **A, B, C**

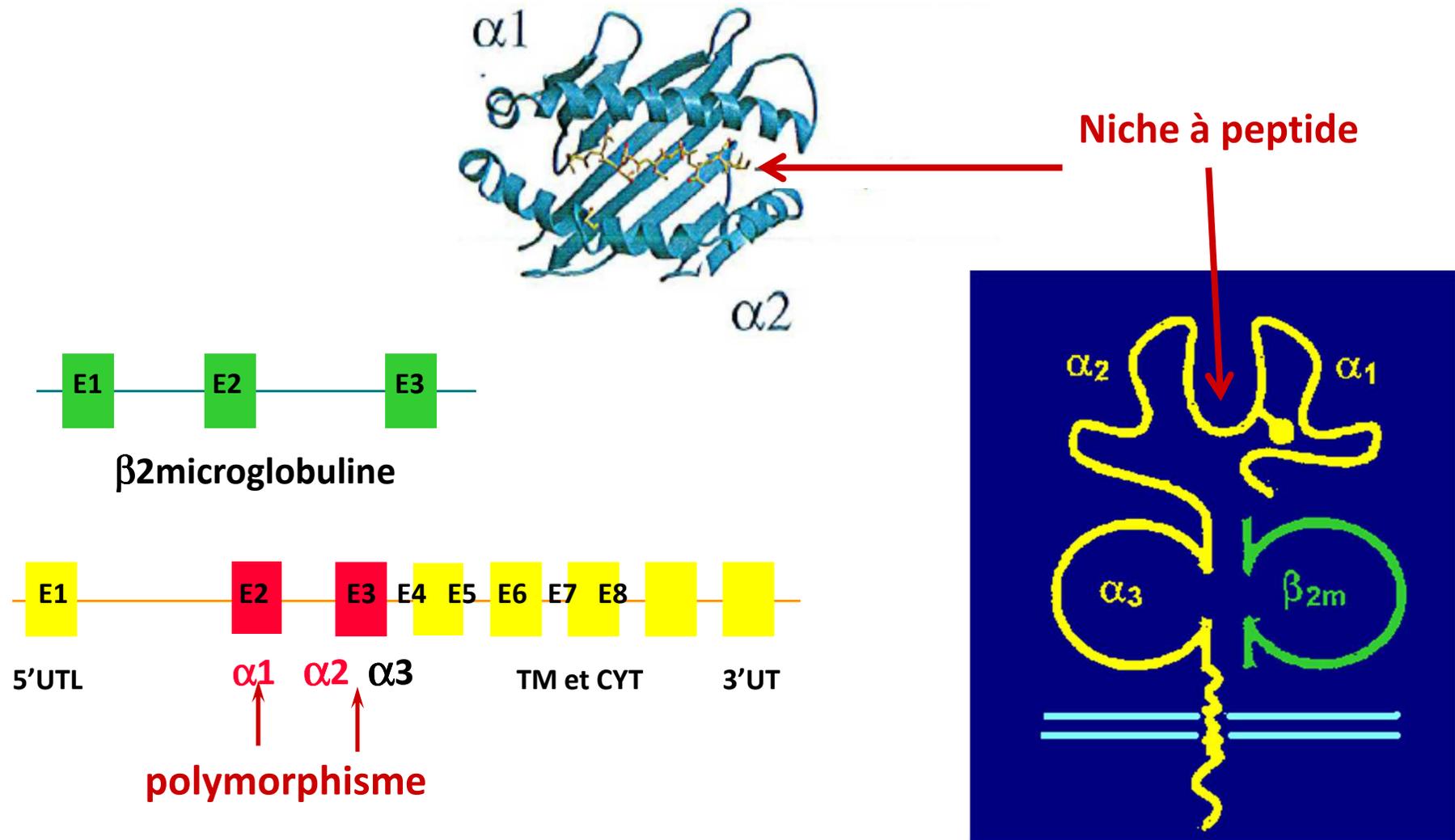
Molécules classe II : **DP, DQ, DR**

# Molécules HLA



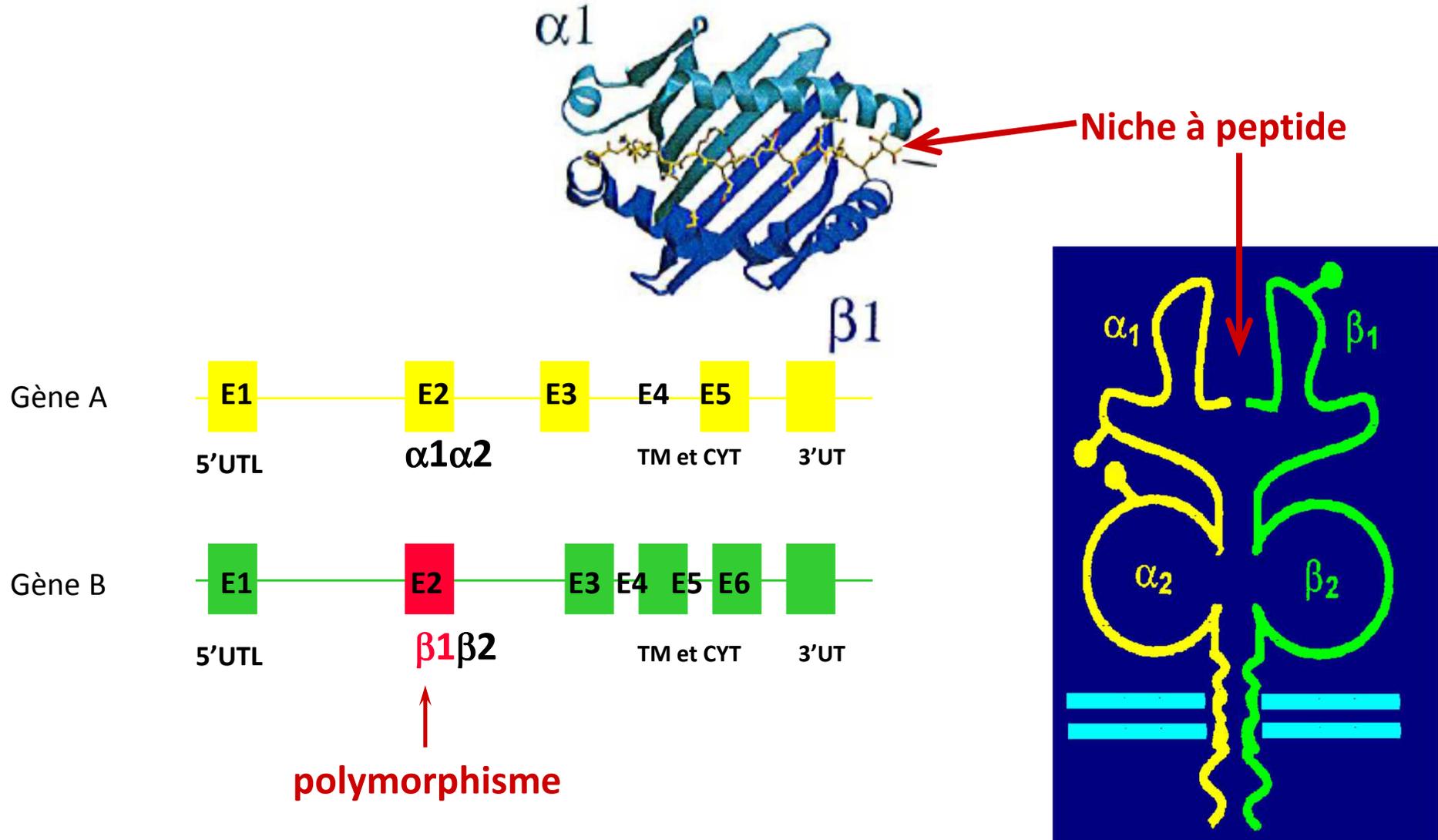
# Molécule HLA de classe I

- 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 **domains**



# Expression des molécules HLA

- Distribution tissulaire

- **Classe I :**

- Sur **toutes les cellules nucléées** (de  $10^4$  à  $5 \times 10^5$  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  $\gamma$  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

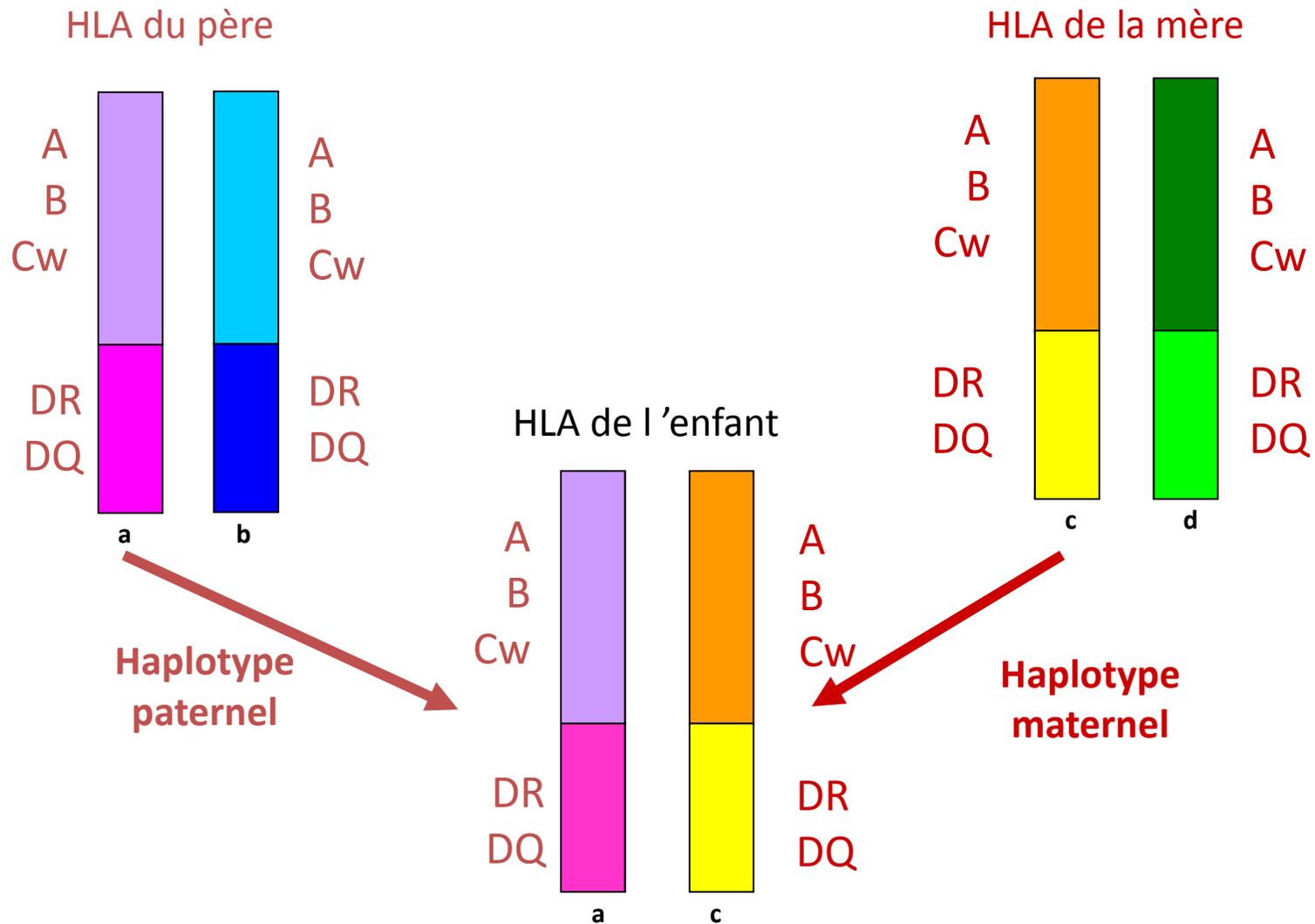
Décembre 2014

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

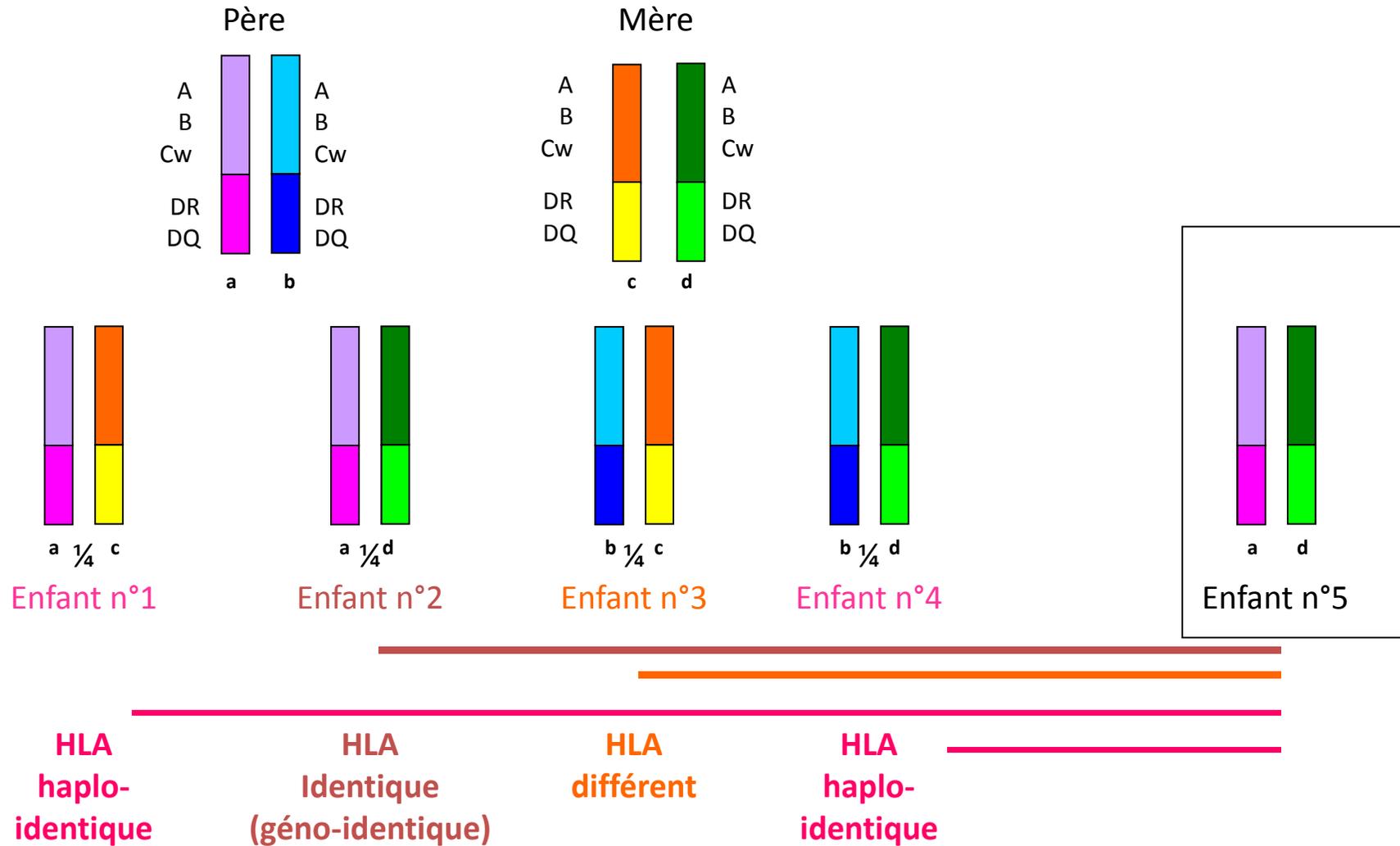
HLA Class II						
Gene	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
Alleles	7	1,684	52	712	38	472
Proteins	2	1,237	32	473	19	390
Nulls	0	42	1	17	0	13

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

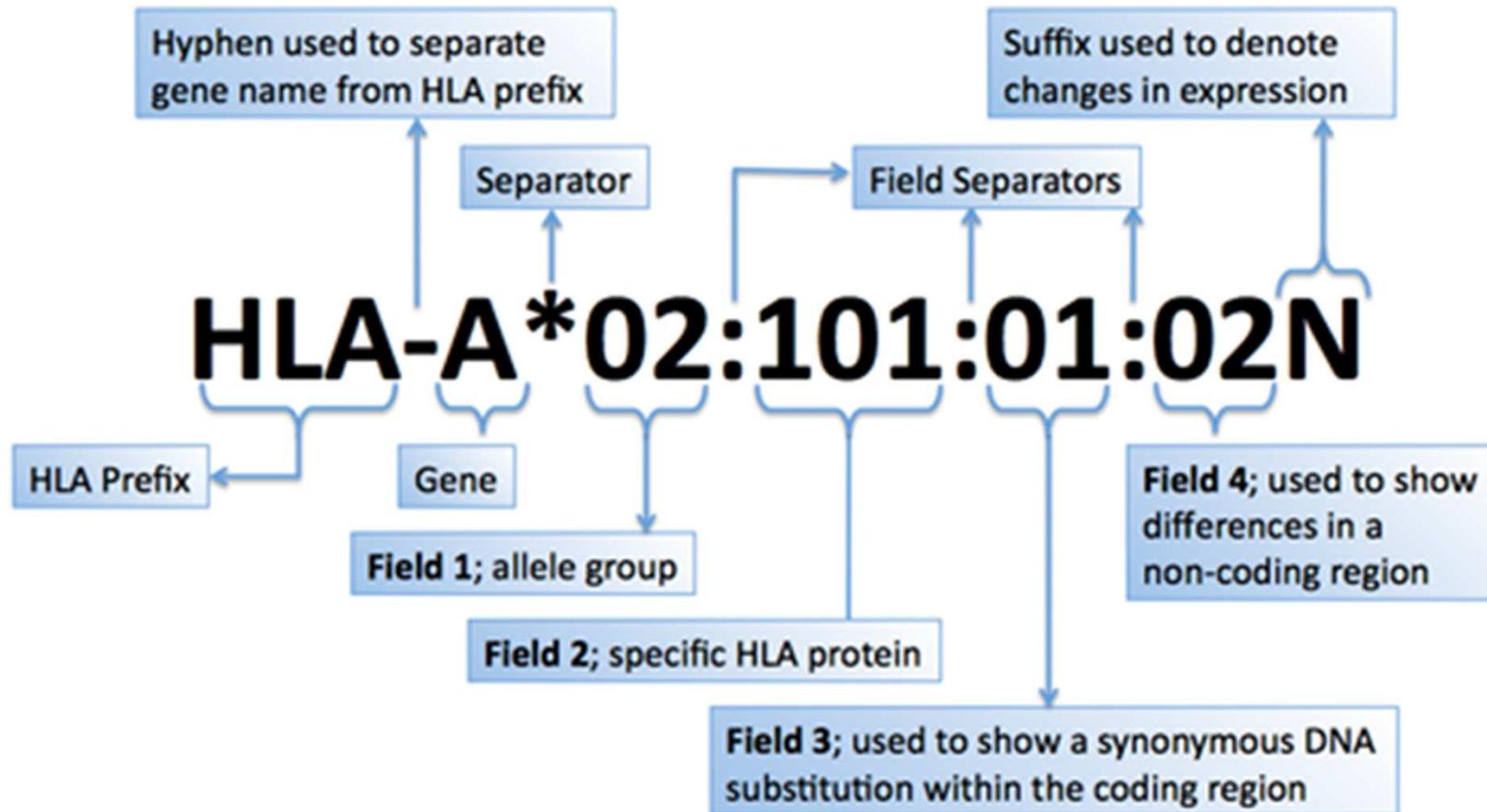
# Nomenclature HLA

- **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 »

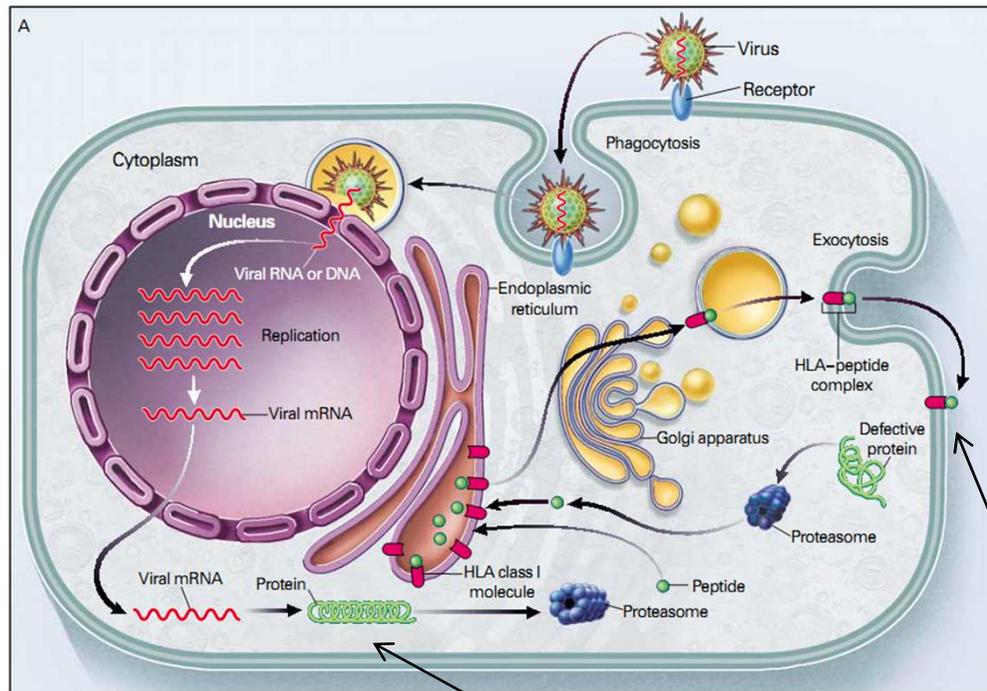
*Exemple :*



## NOMENCLATURE HLA



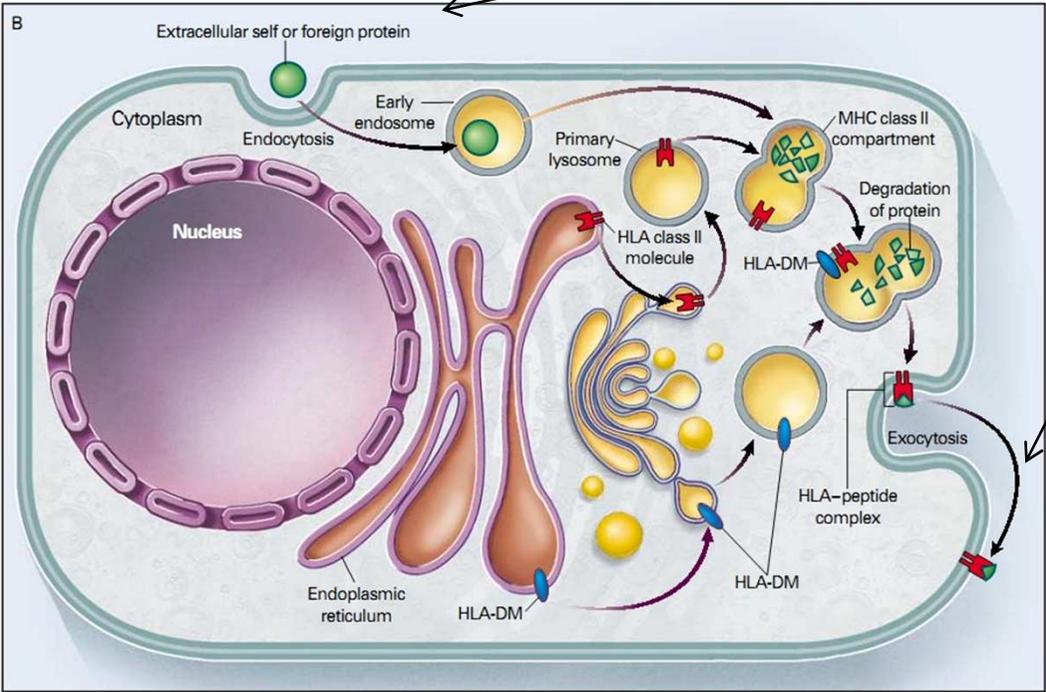
## Rôle dans le système immunitaire : présentation de l'antigène



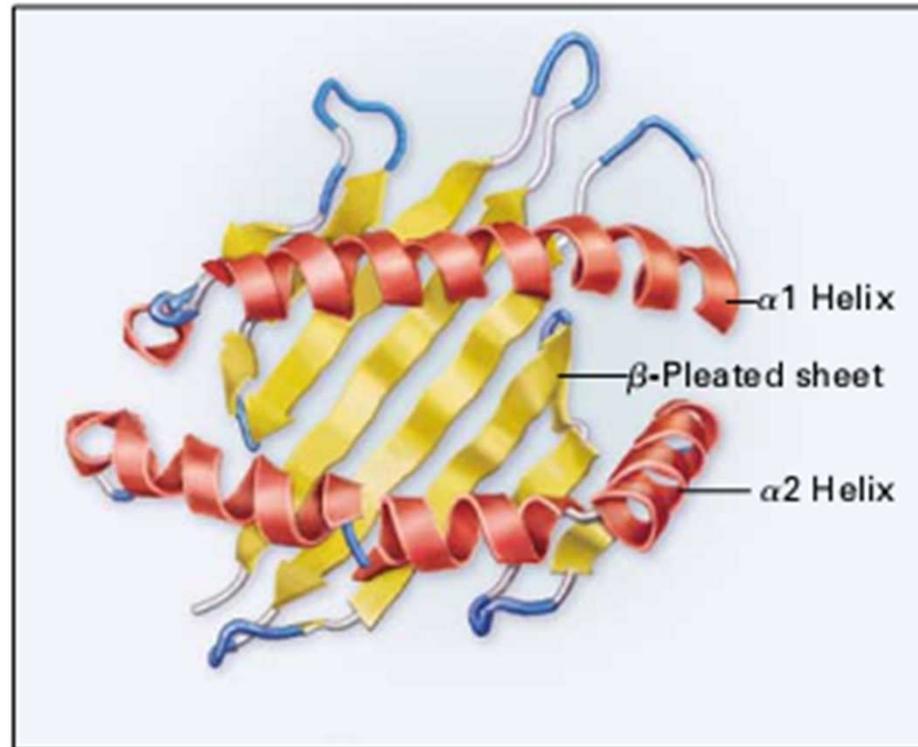
CMH Classe I => intra-cellulaire

Rôle dans le système immunitaire : présentation de l'antigène

CMH classe II => extra-cellulaire



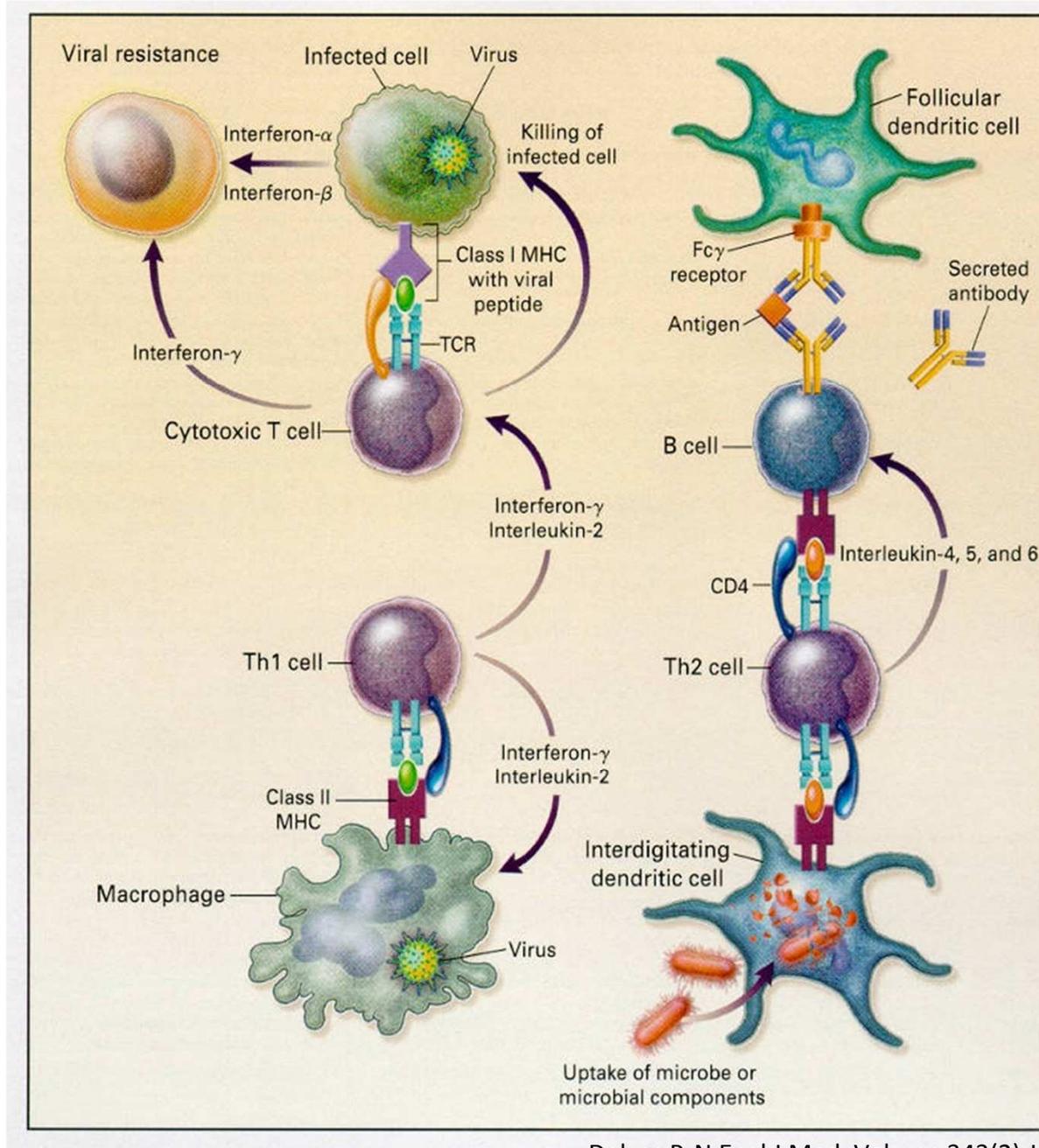
# La niche à peptide



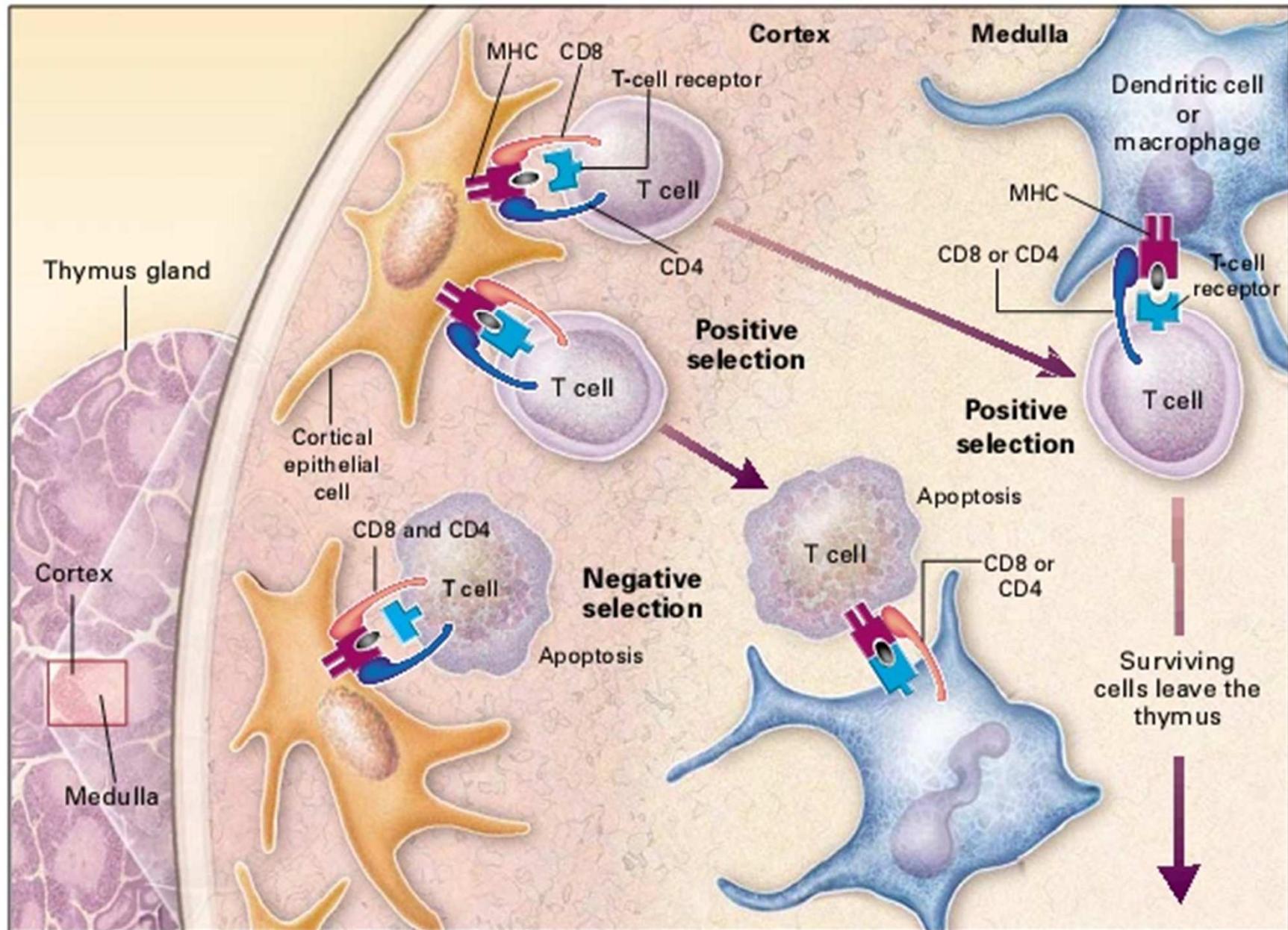
Présentation du peptide aux lymphocytes T

- 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

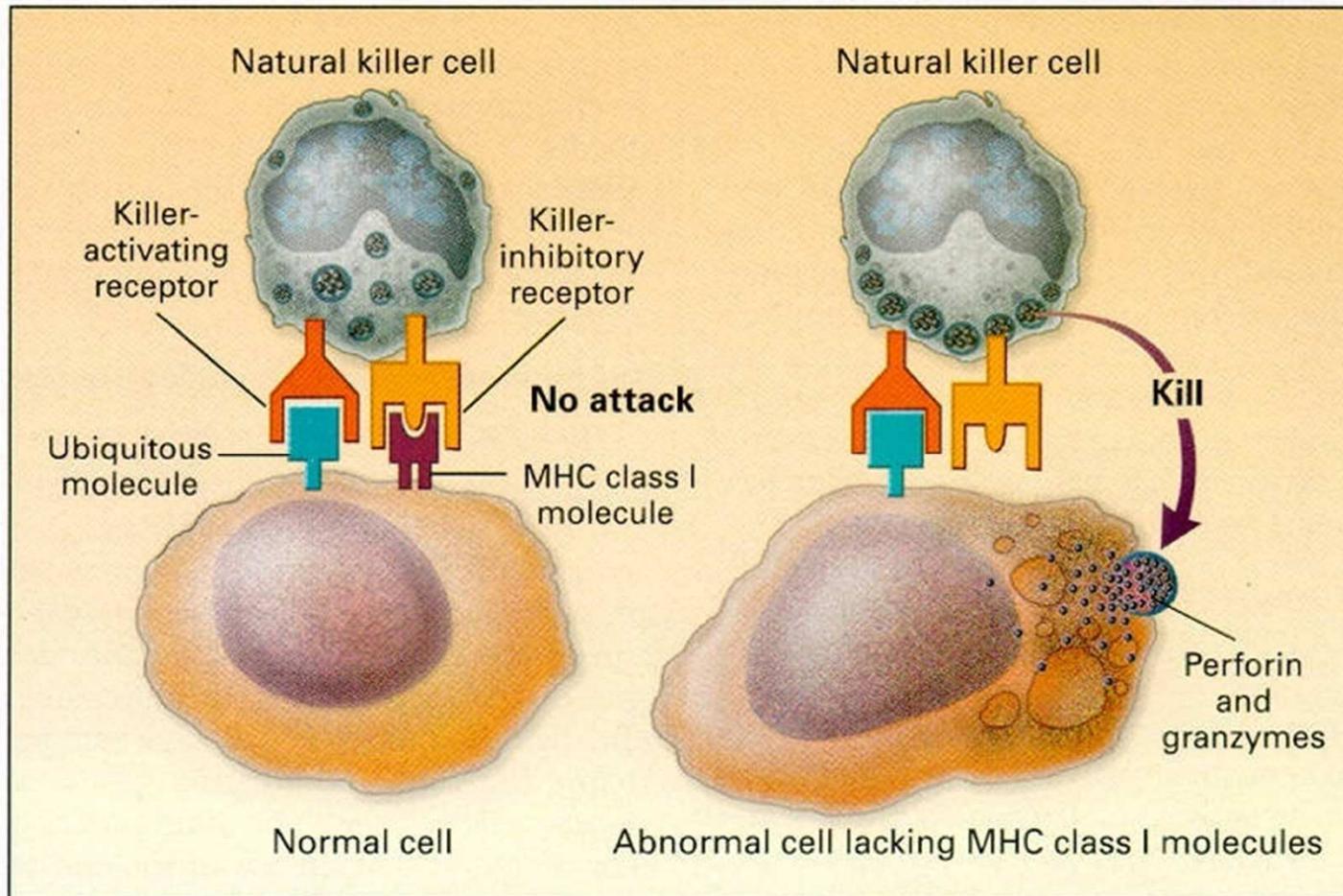
## Vue d'ensemble des fonctions lymphocytaires



## Éducation des lymphocytes T

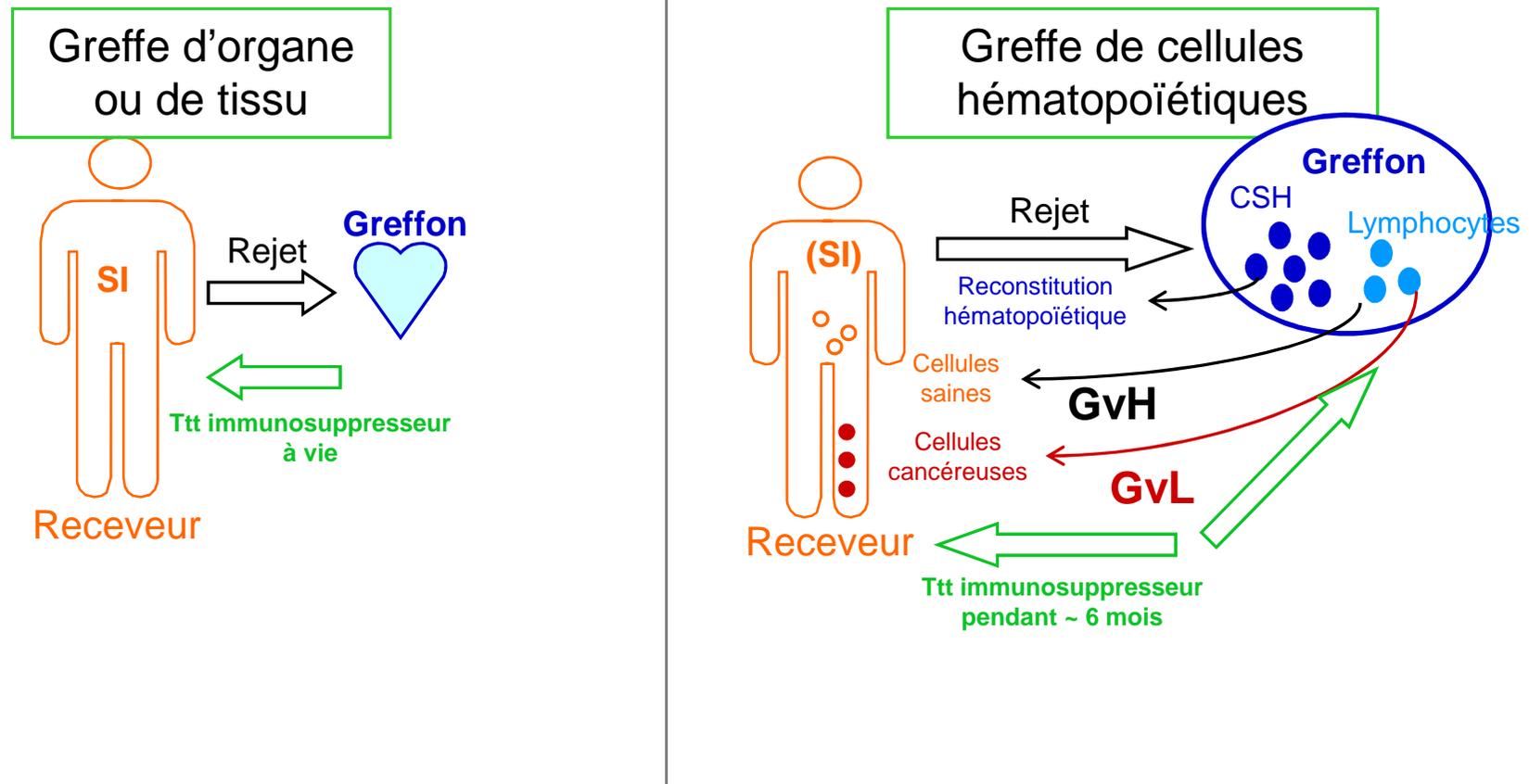


# CMH et lymphocytes NK



# HLA et transplantation

- Mécanismes immunologiques et conséquences



# HLA et transplantation

- Greffe d'organe

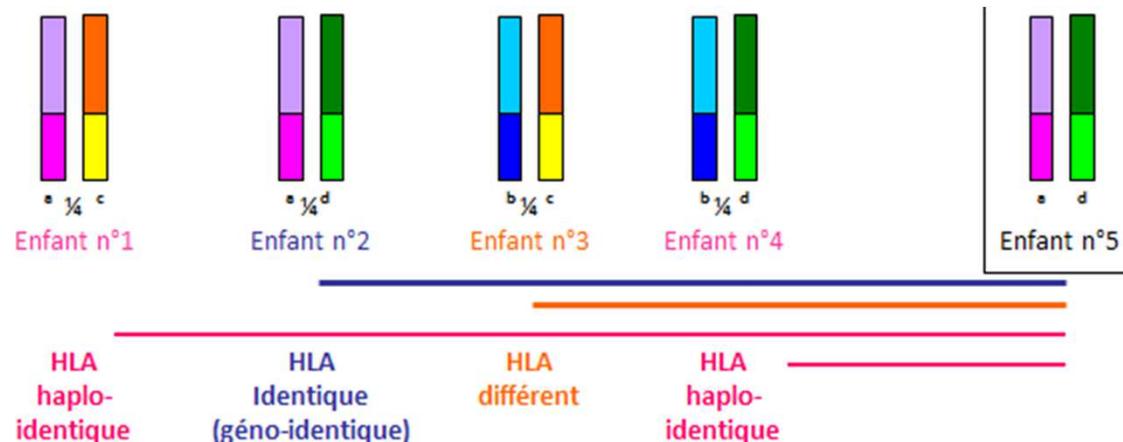
- S'assurer de l'absence chez le receveur d'Ac anti-HLA dirigés contre le donneur

- 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

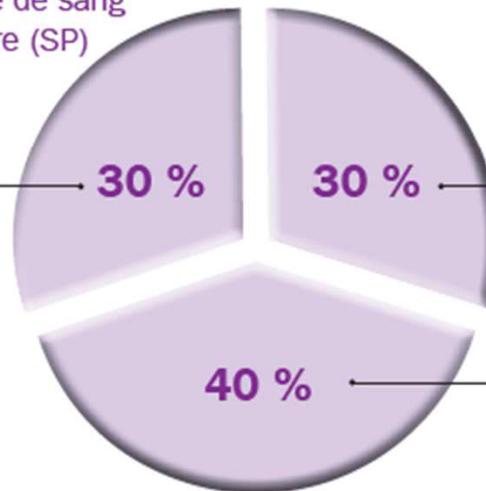
# Greffe CSH

## 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

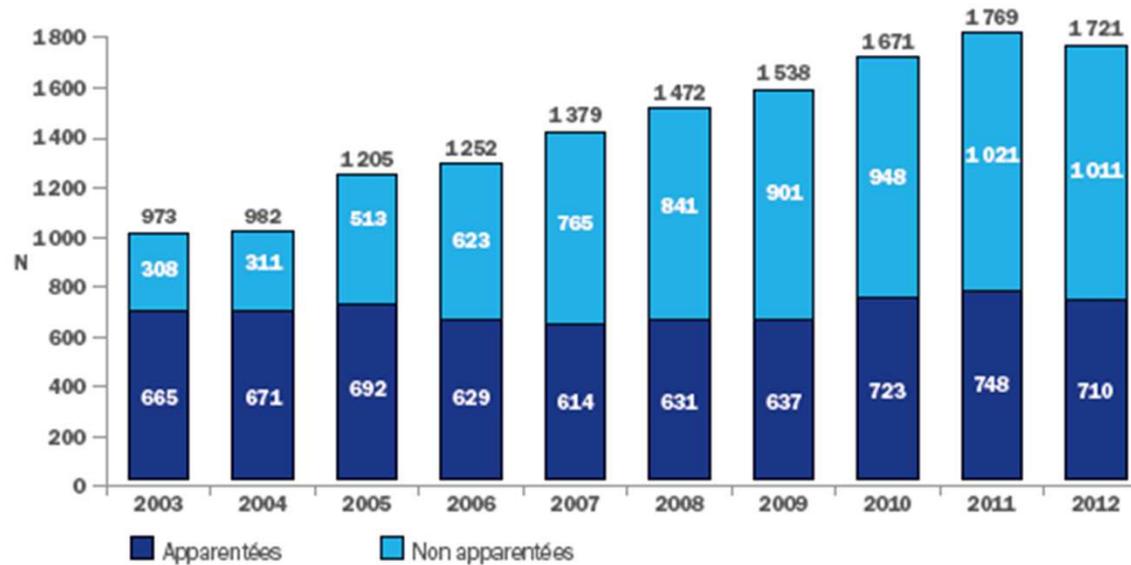
- Etude du chimérisme

# 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

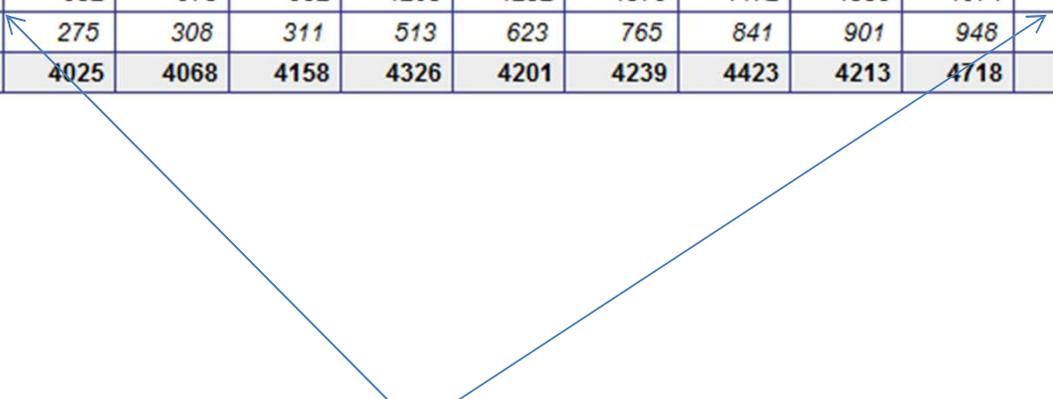


# Evolution nombre allogreffes

Tableau CSH G1. Evolution du nombre de greffes de CSH

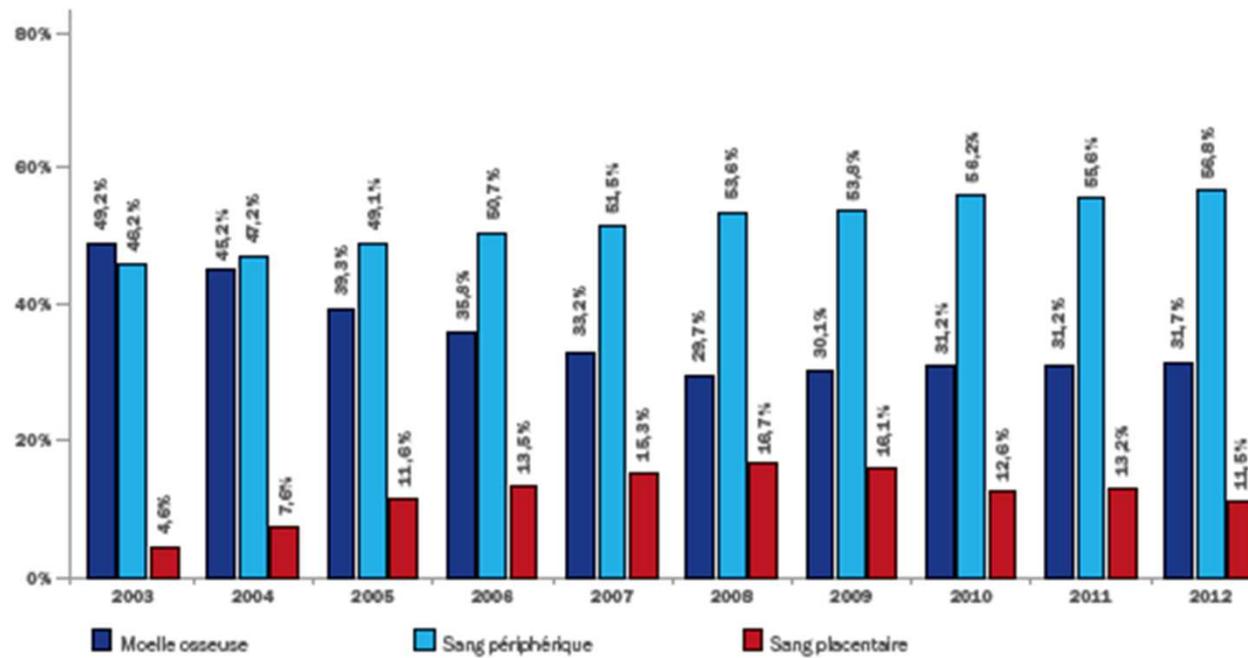
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Nombre de greffes autologues	3091	3093	3095	3176	3121	2949	2860	2951	2675	3047	3003
Nombre de greffes allogéniques	855	932	973	982	1205	1252	1379	1472	1538	1671	1769
<i>Dont greffes non apparentées</i>	227	275	308	311	513	623	765	841	901	948	1021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

x 2 en 10 ans

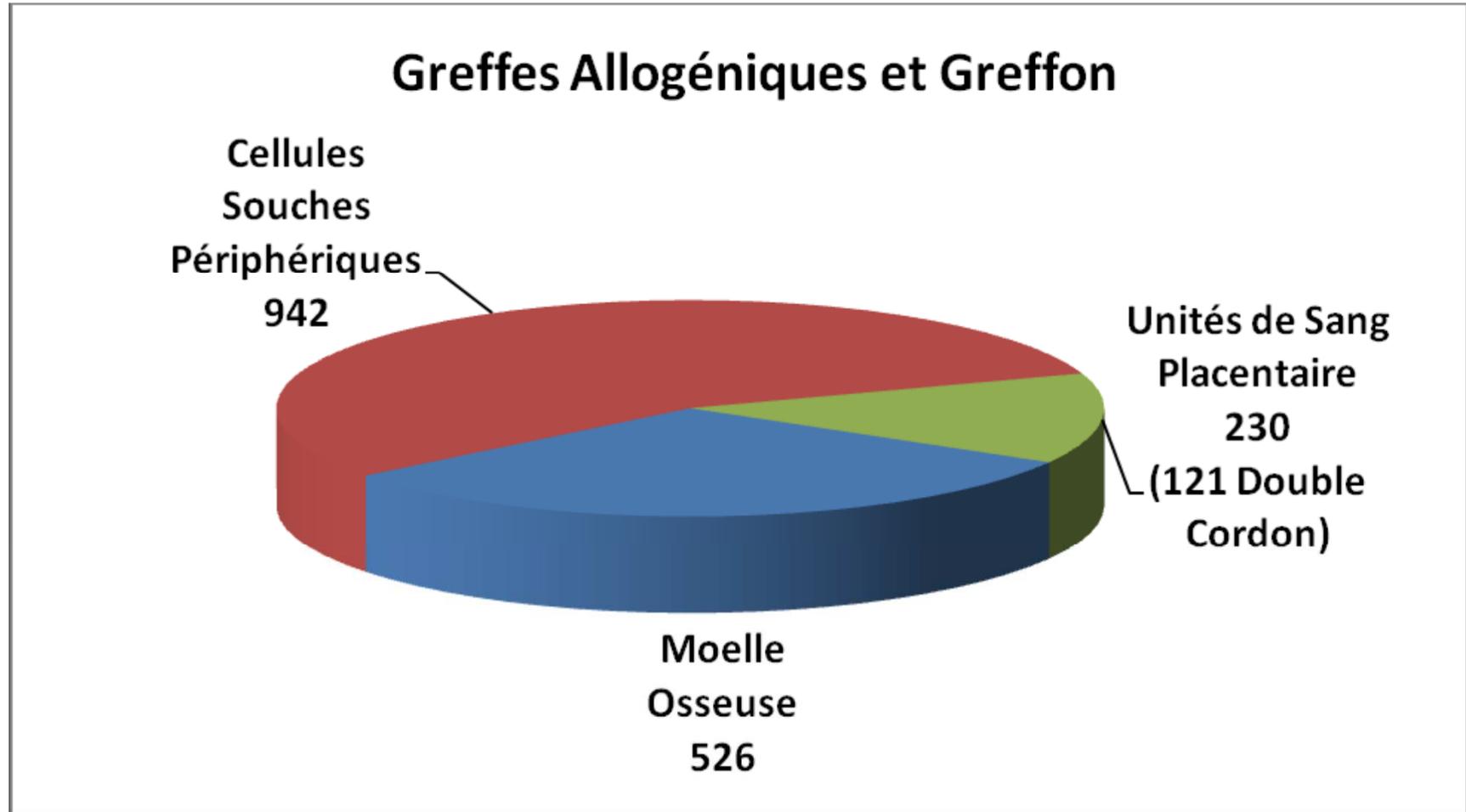


# Mise à jour 2012

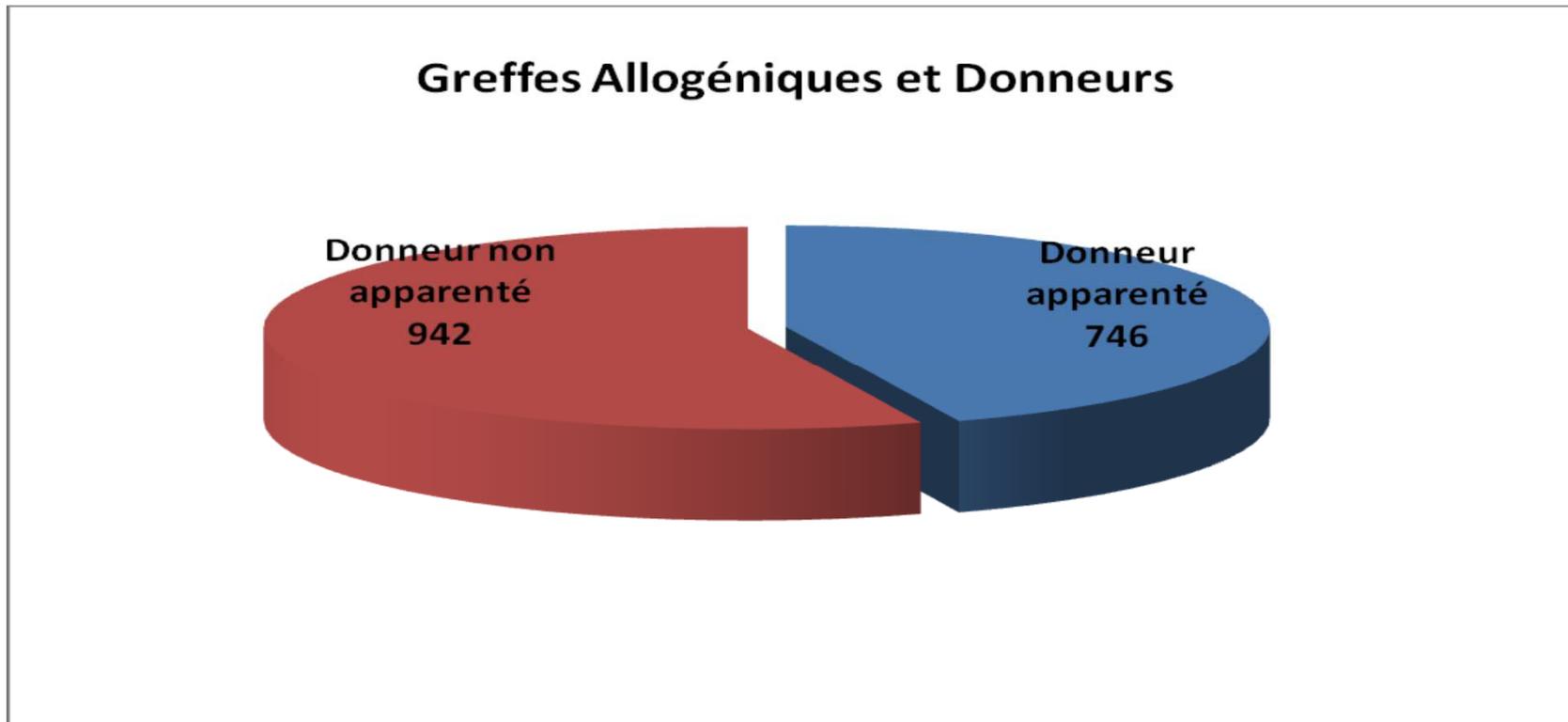
ÉVOLUTION DE LA RÉPARTITION DES SOURCES DE GREFFONS DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOIÉTIQUES ALLOGÉNIQUES



# Greffes de CSH en 2011



# Greffes CSH en 2011



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

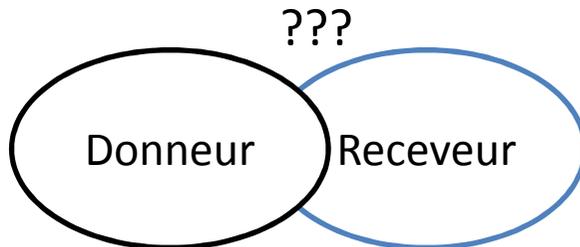
# Greffes de CSH

- 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

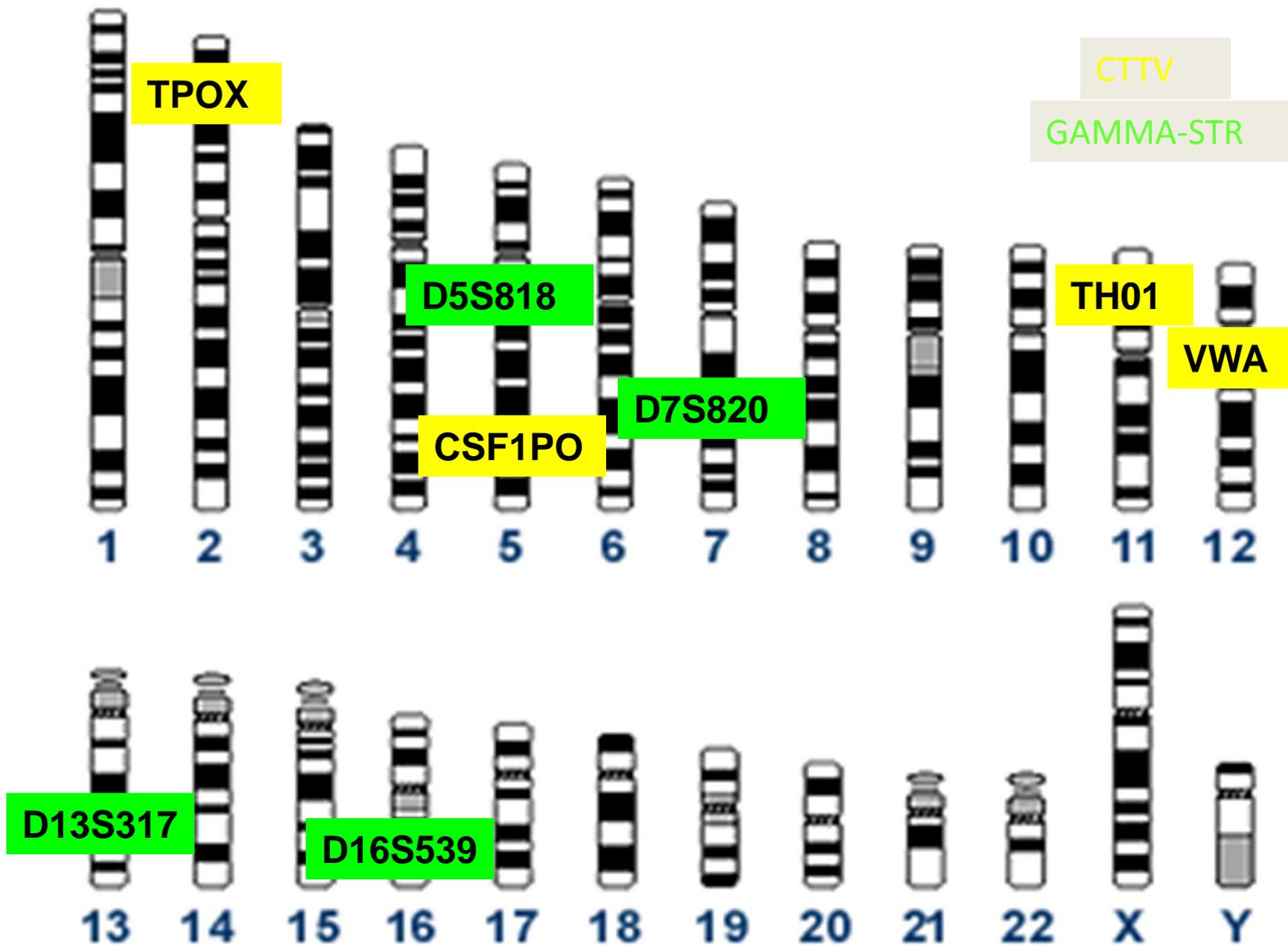
Individu 2:

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

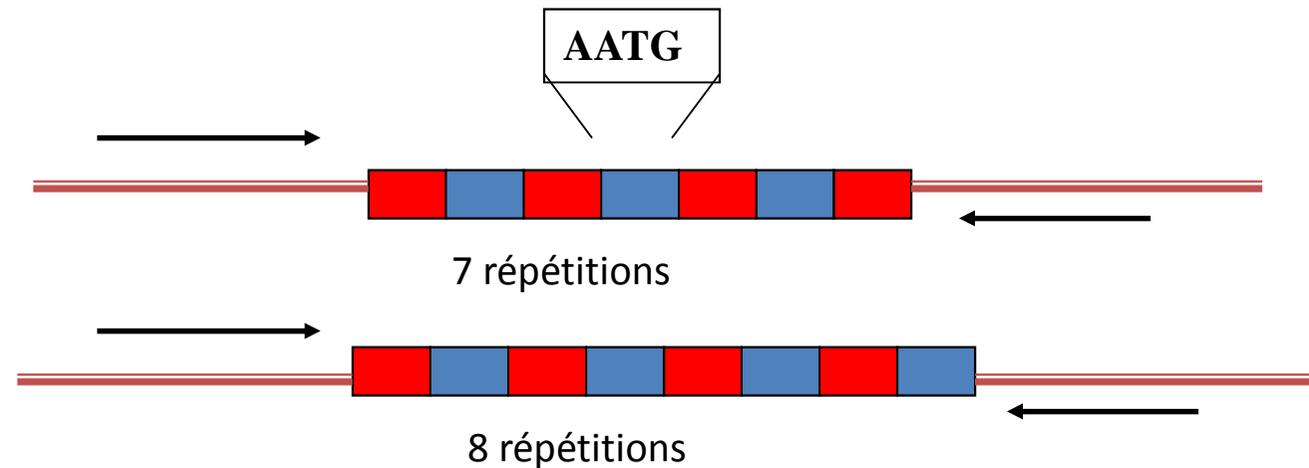
Chaque individu est caractérisé par le nombre de répétition sur chaque locus, 1 STR (par allèle) hérité de chacun de ses parents

# 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

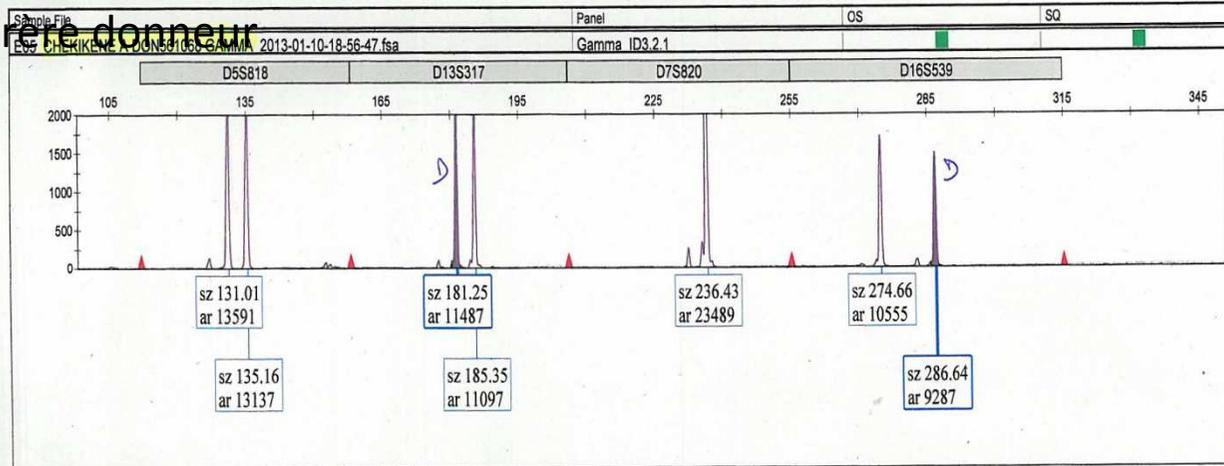
(Les couples d'amorces contiennent les amorces 5' et 3' qui encadrent les séquences répétitives à amplifier. Une des amorces de chacun des couples utilisés est marquée en 5' par un fluorochrome (la fluorésceine).

- Migration électrophorétique sur séquenceur

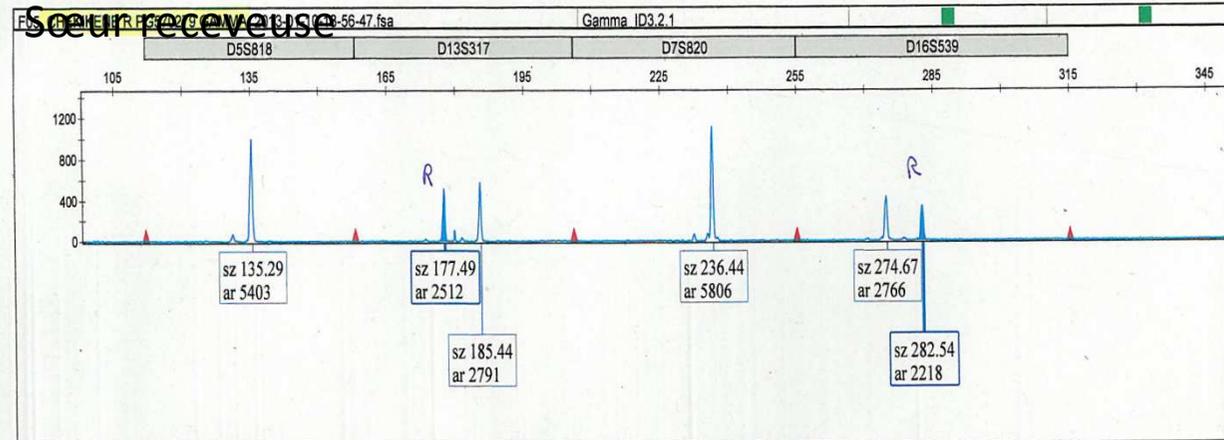
→ séparation des STR en fonction de la taille et la fluorescence

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

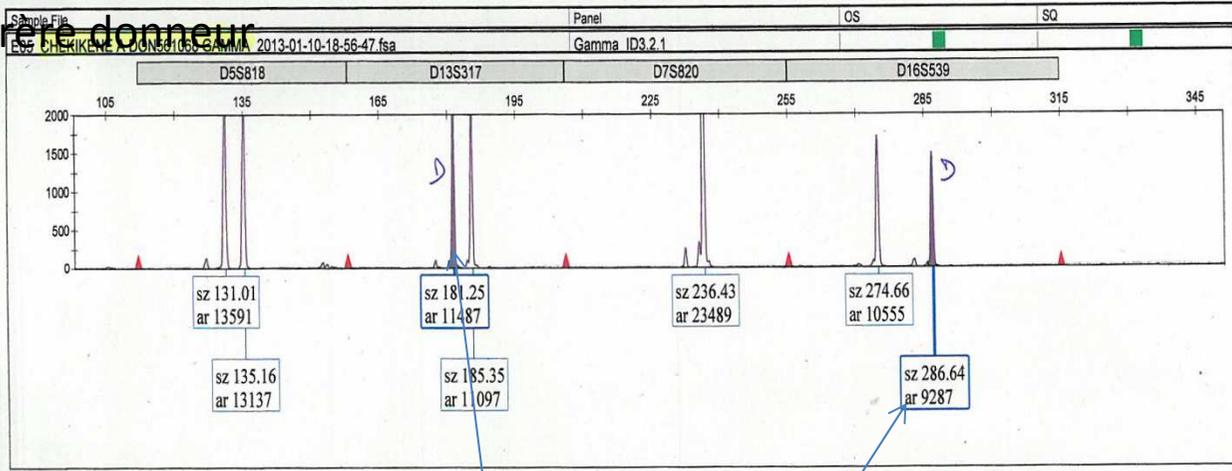
Frère donneur



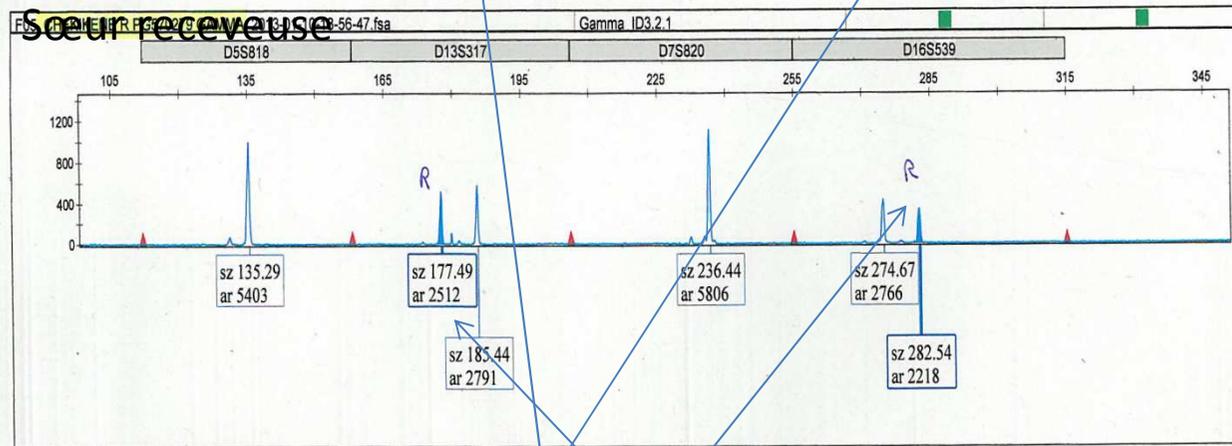
Sœur receveuse



Frère donneur



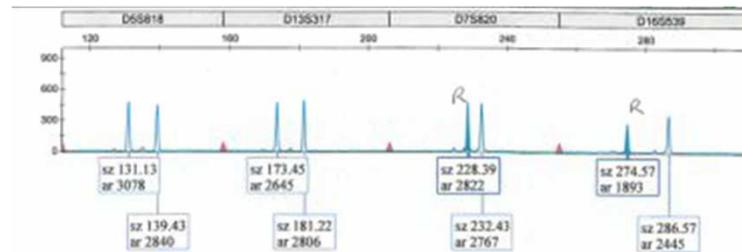
Sœur receveuse



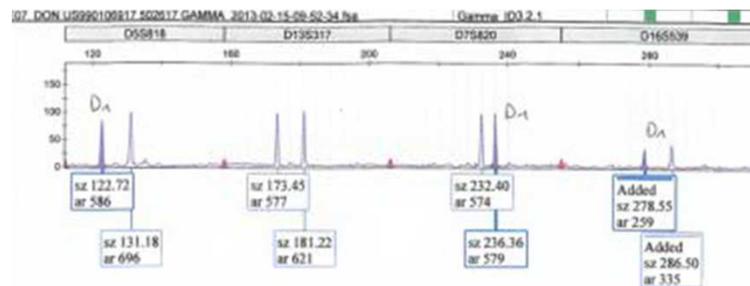
Etablissement profil D et R

# Cas des doubles greffes USP

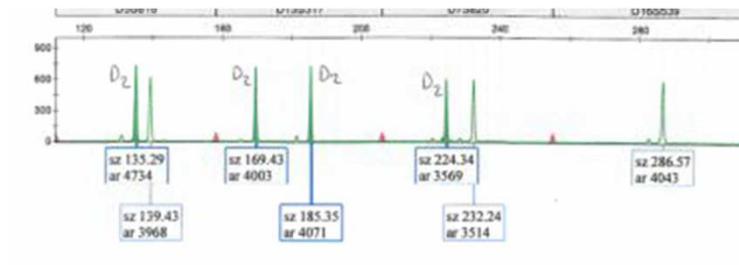
- Etablissement profil receveur

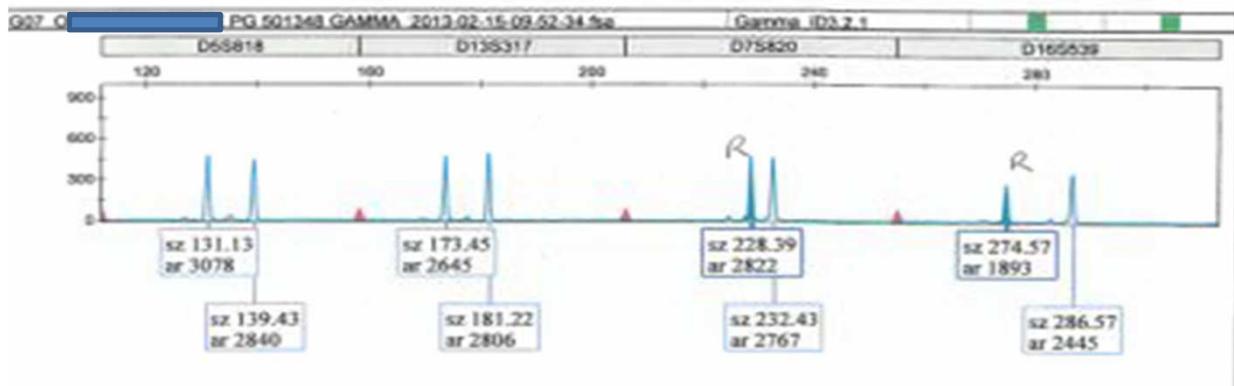
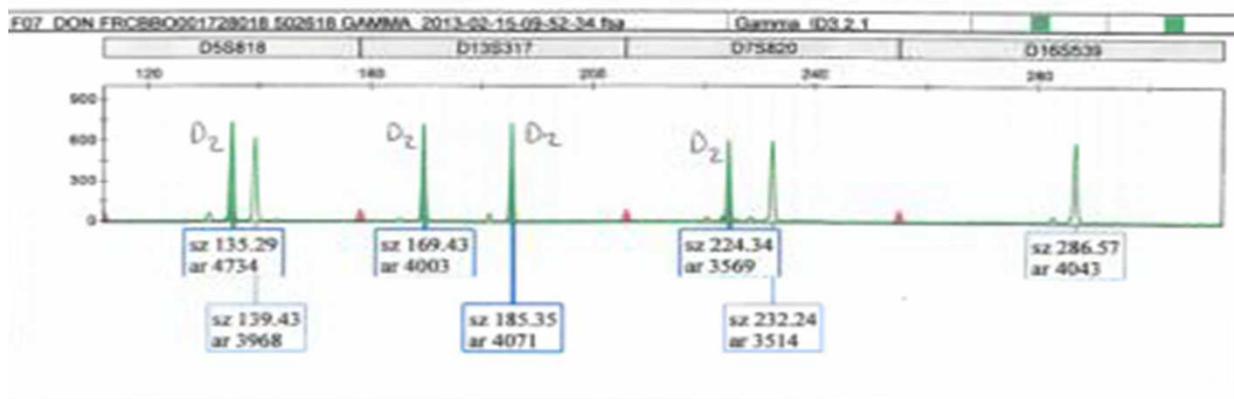
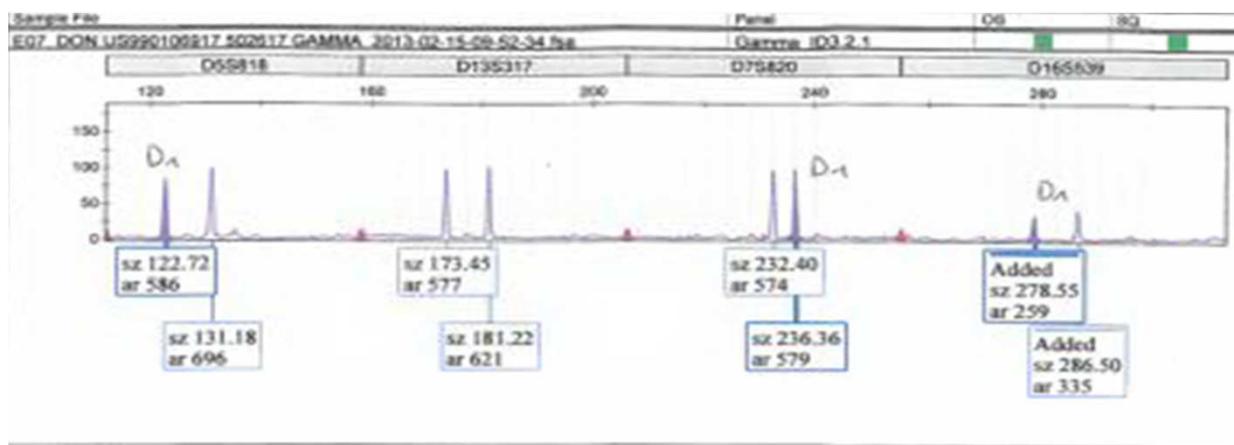


- Etablissement profil donneur USP1



- 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)

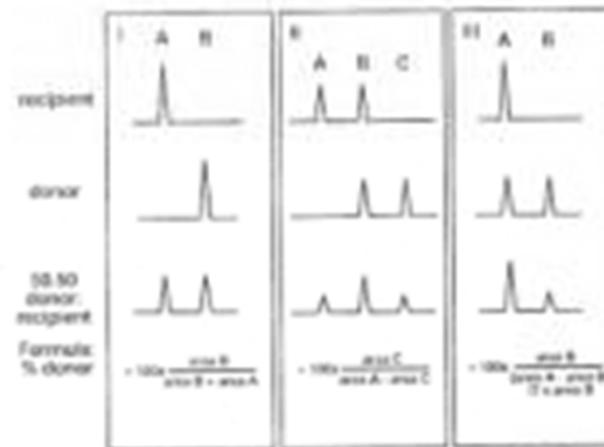


Figure 1 Schematic illustration of calculations performed for the quantitative assessment of mixed chimerism. I. Calculation in alleles for which both donor and recipient have distinct peaks. II. Calculation in the situation of two heterozygous alleles, with one allele shared. III. Calculation of

# Chimérisme STR

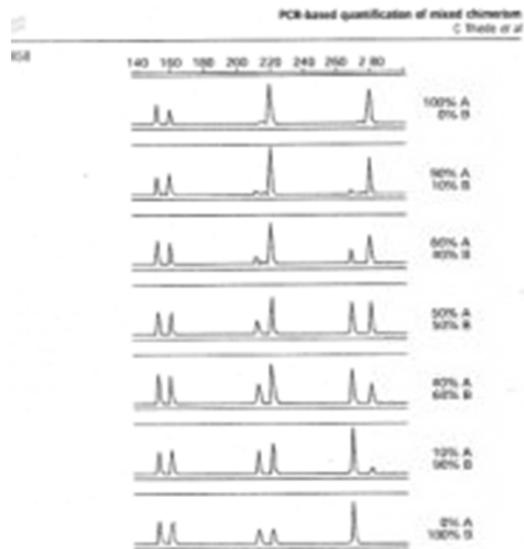


Figure 2. Electropherograms obtained from cell dilution samples. The alleles shown are D19S11, D1S2311, D7S828 labeled with the fluorophore NED. The actual cell mixtures are shown in each lane.

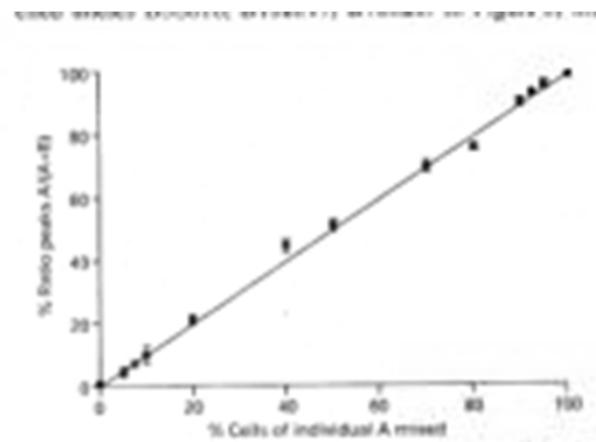


Figure 3. *In vitro* testing of STR-PCR for quantification of mixed chimerism. Representative experiment showing the correlation between cell mixture and the ratio of peak areas derived from genotyping. The data points

# 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

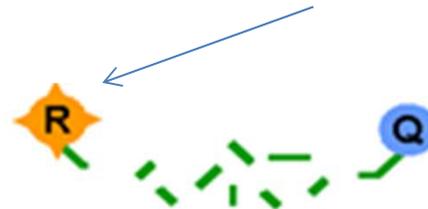
# Sonde TaqMan

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

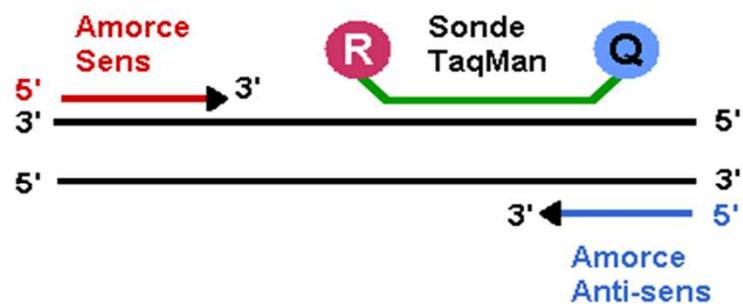
- Si les 2 marqueurs sont attachés : aucune émission fluorescente



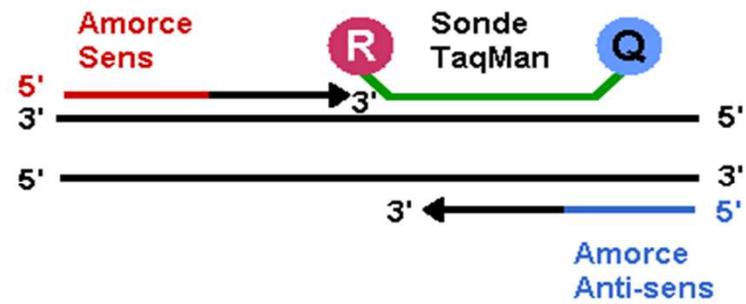
- Si le reporter est clivé : émission de fluorescence



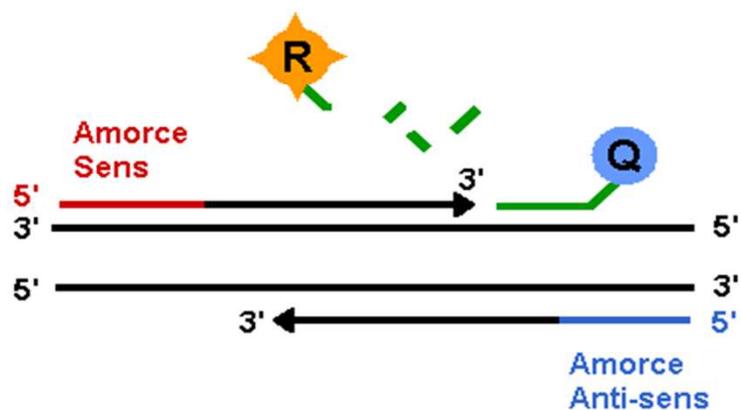
### 1 Hybridation



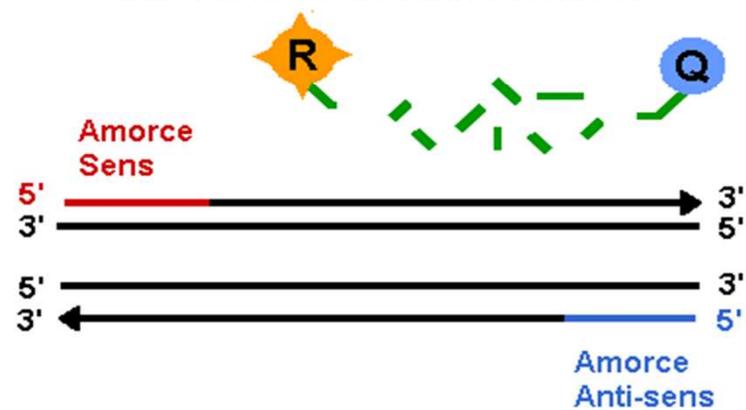
### 2 Elongation

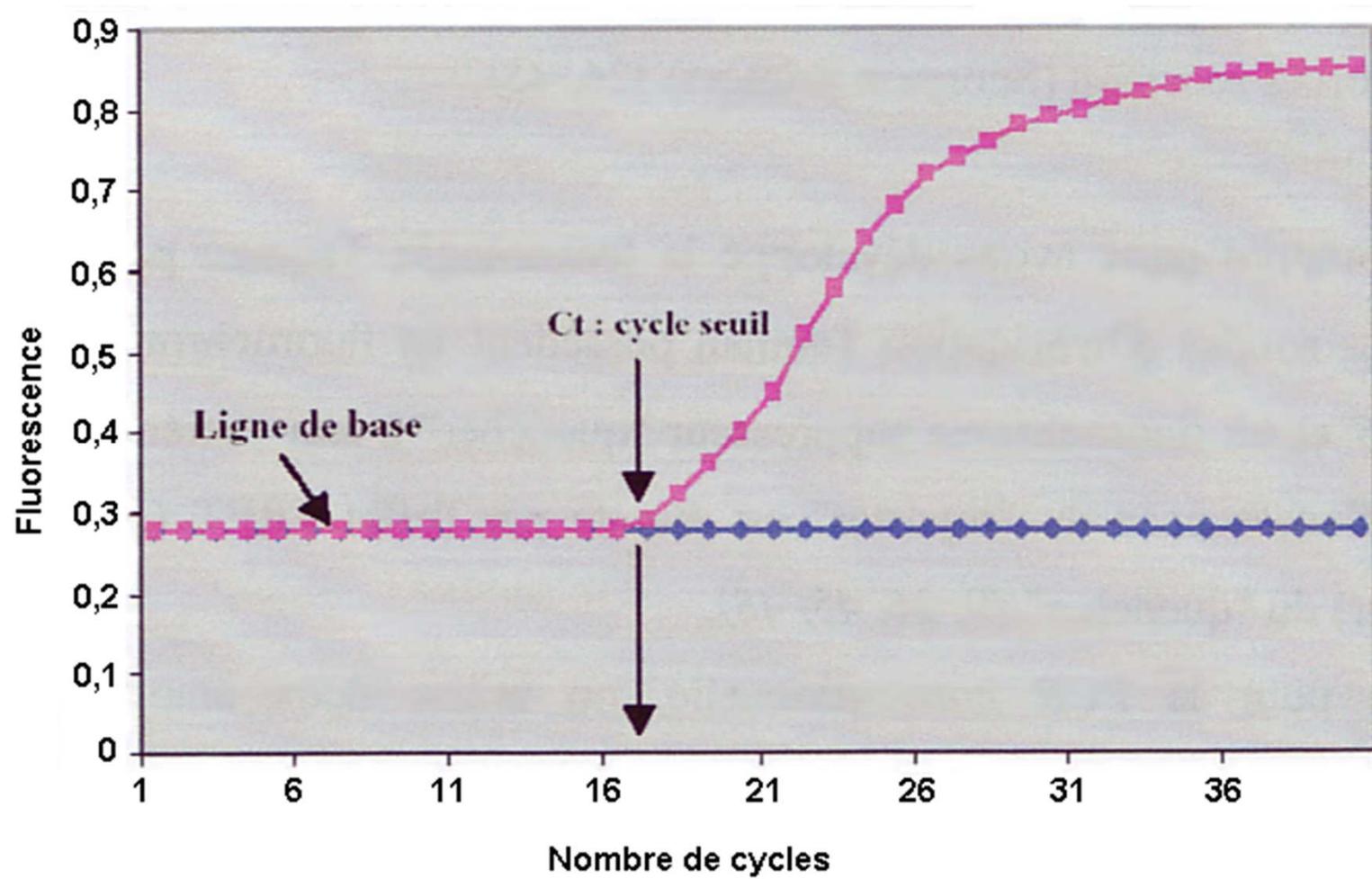


### 3 Clivage de la sonde Libération de la fluorescence

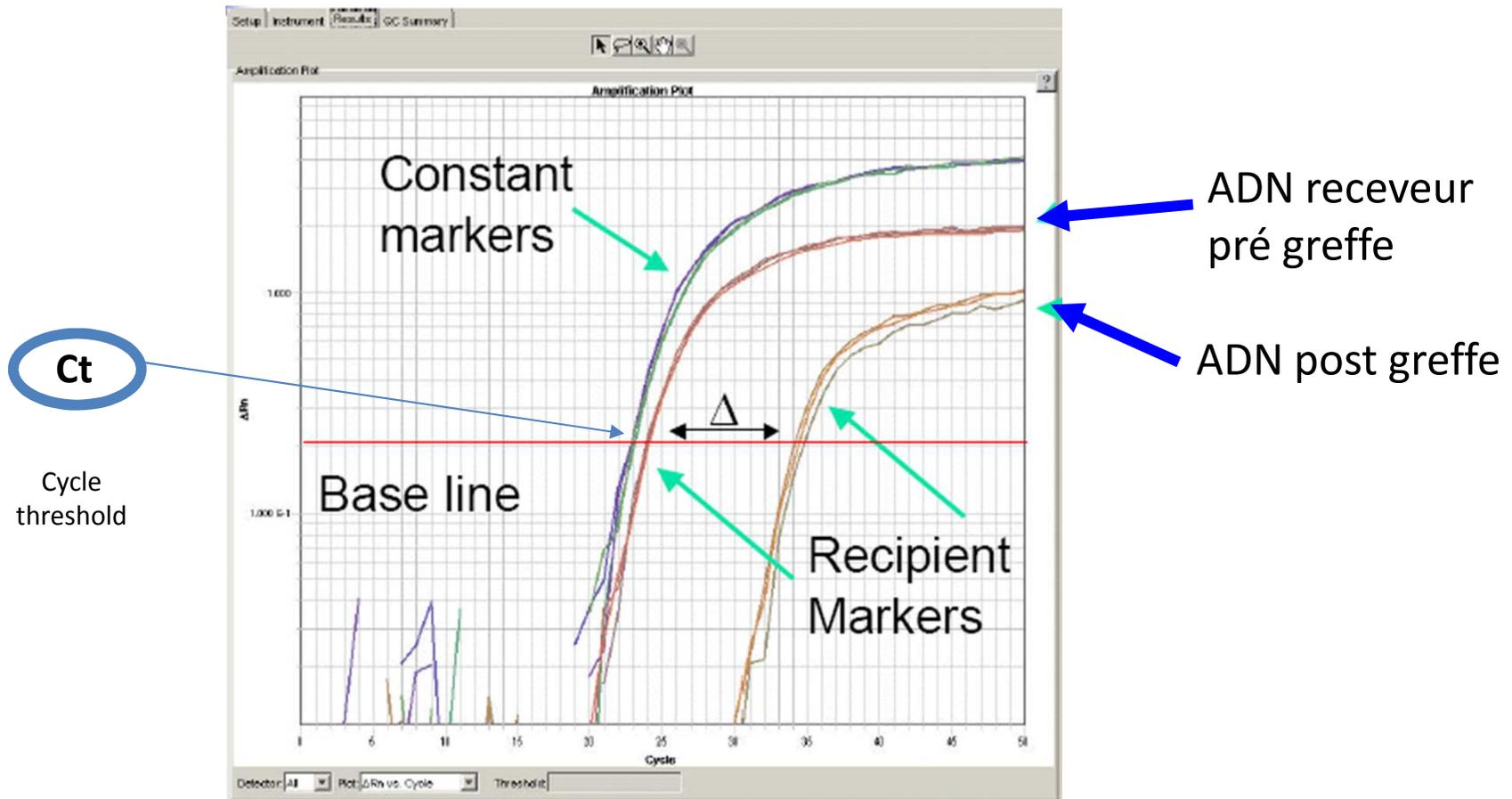


### 4 Fin de l'élongation Emission de la fluorescence

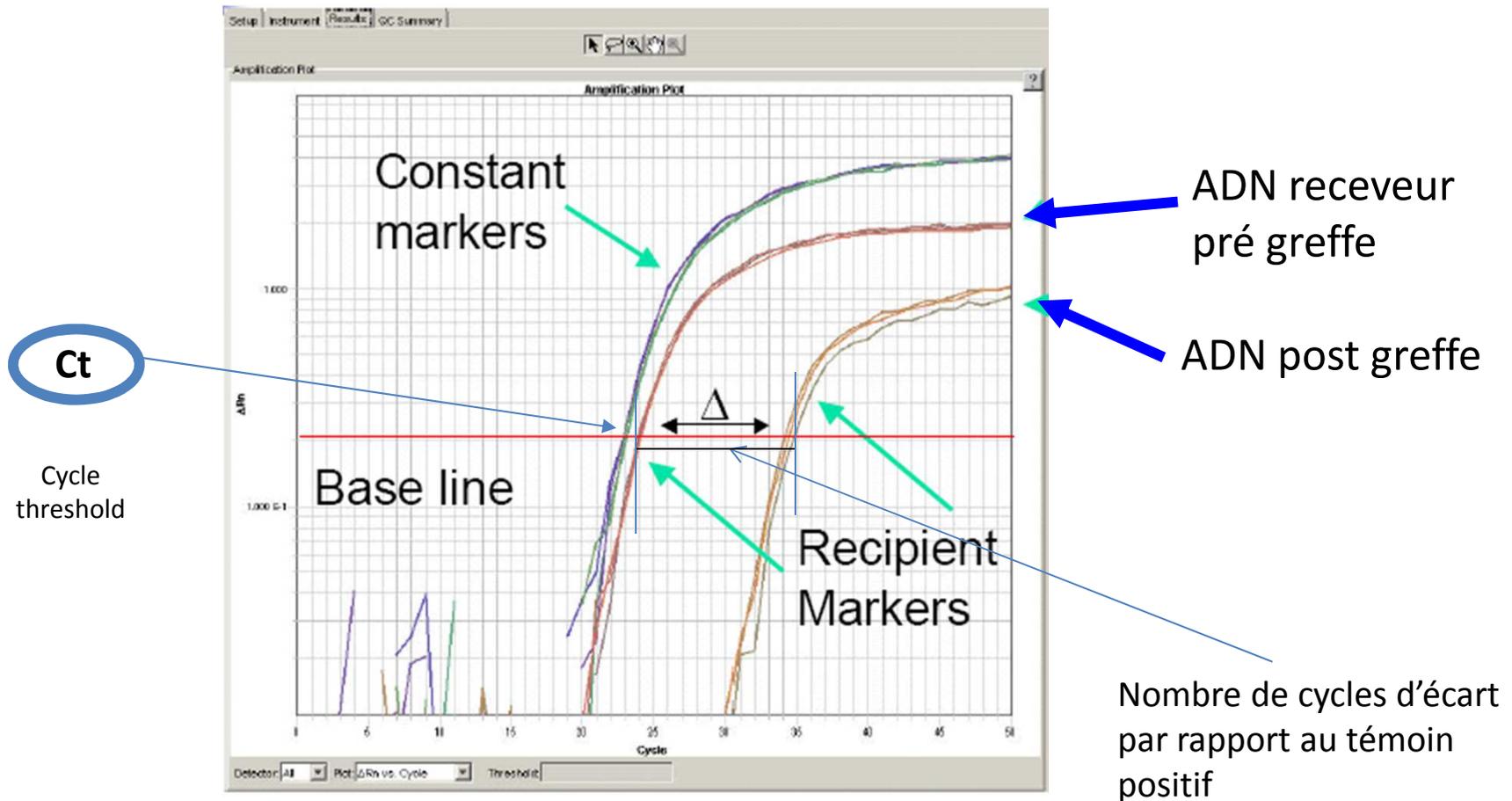




# INTERPRETATION

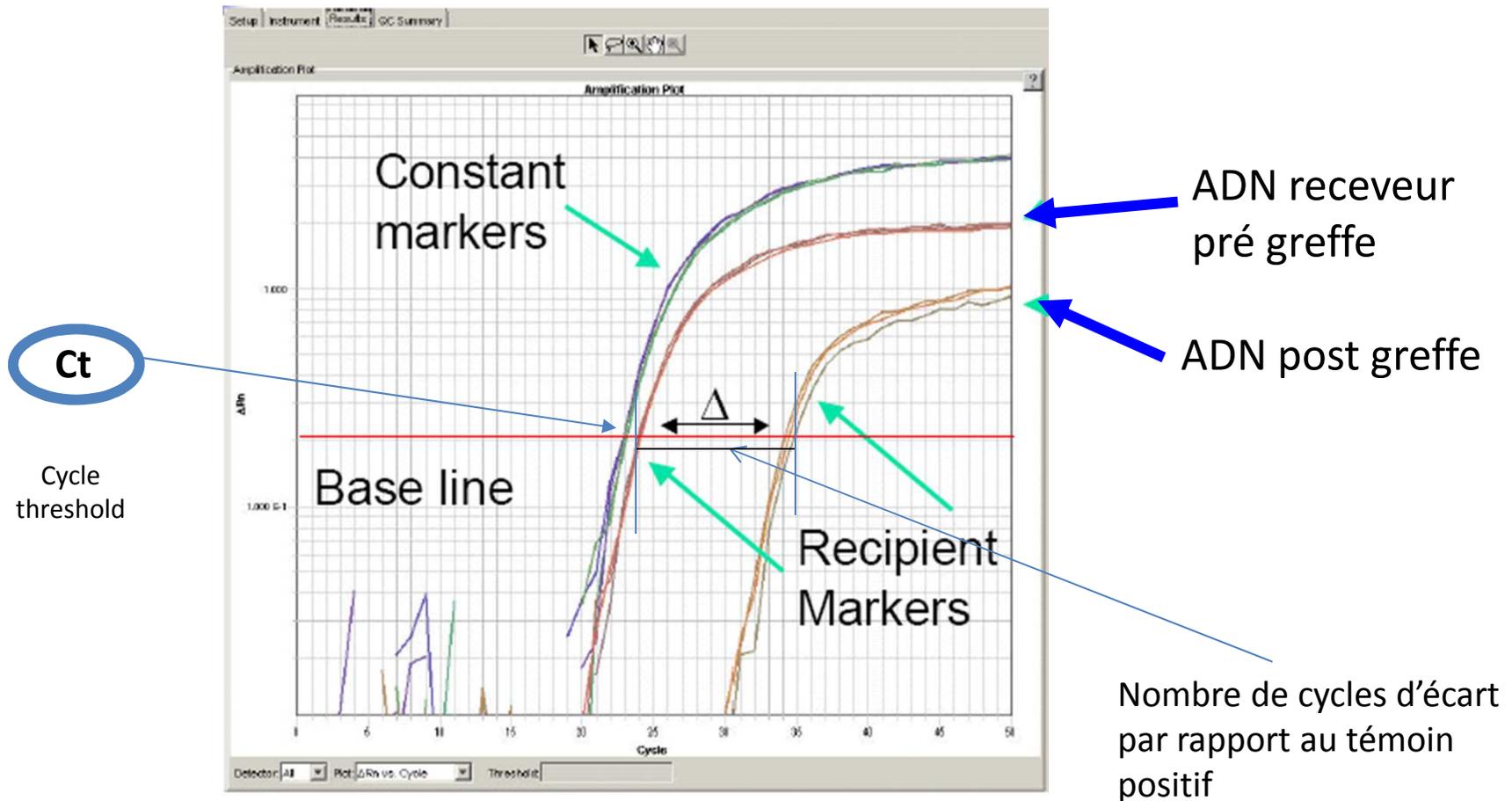


# INTERPRETATION



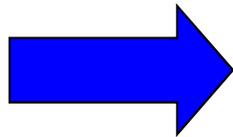
- A chaque cycle de PCR, on augmente d'un facteur 2 la quantité d'ADN
- Donc, inversement, à chaque cycle d'écart, la quantité d'ADN est divisée par 2
  - à un cycle : 50%
  - à 2 cycles : 25%
  - à 3 cycles : 12,5%
  - .....
  - à 12 cycles : 0% ADN

# 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	31.3138	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	23.7708	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	31.8283	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	31.8828	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	25.0686	24.9684	0.0996	-0.0278	101.9456	No

# LIMITES DE LA TECHNIQUE

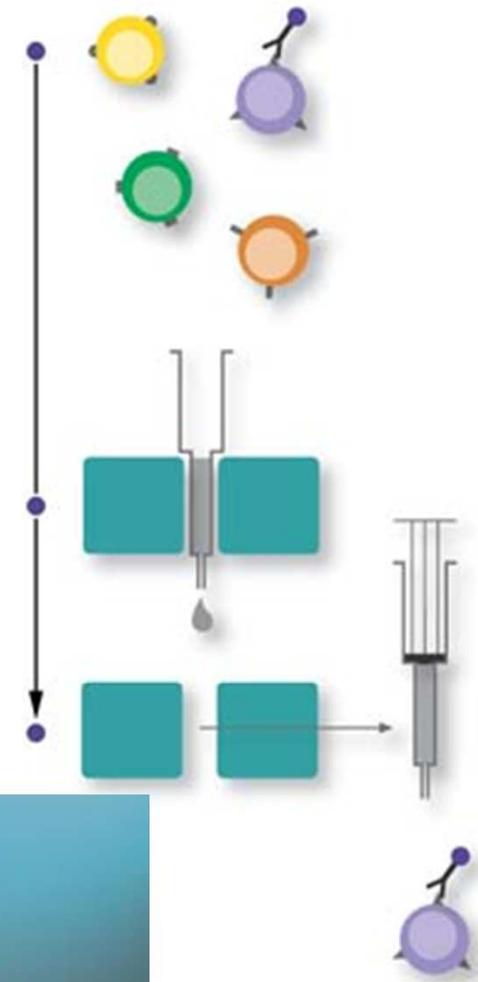
- Quantité ADN
- Non adapté aux séries
- 1 seul système étudié : micro contaminations de l'ADN liées à l'extraction peuvent perturber les résultats

# 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

	<b>SANG</b>	<b>MOELLE</b>
<b>LAM</b>	<b>CD33</b>	<b>CD34</b>
<b>LMC</b>	<b>CD15</b>	
<b>LLC</b>	<b>CD19</b>	
<b>MM</b>		<b>CD138</b>

+ 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

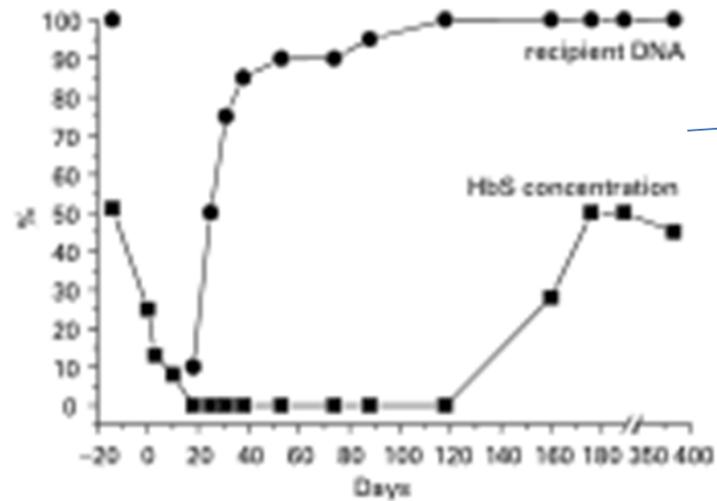
- Pathologies non malignes

- 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)