

# De la cellule à l'ADN: détection et prise en charge d'une hémopathie au laboratoire

*AFTLM-journées professionnelles 28&29 nov 2019*

*Laboratoire d'Hématologie-Immunologie*

*Département Biologie&Pathologie Médicales*

*Cytologie: Mme C. NAITHAMOUCHE*

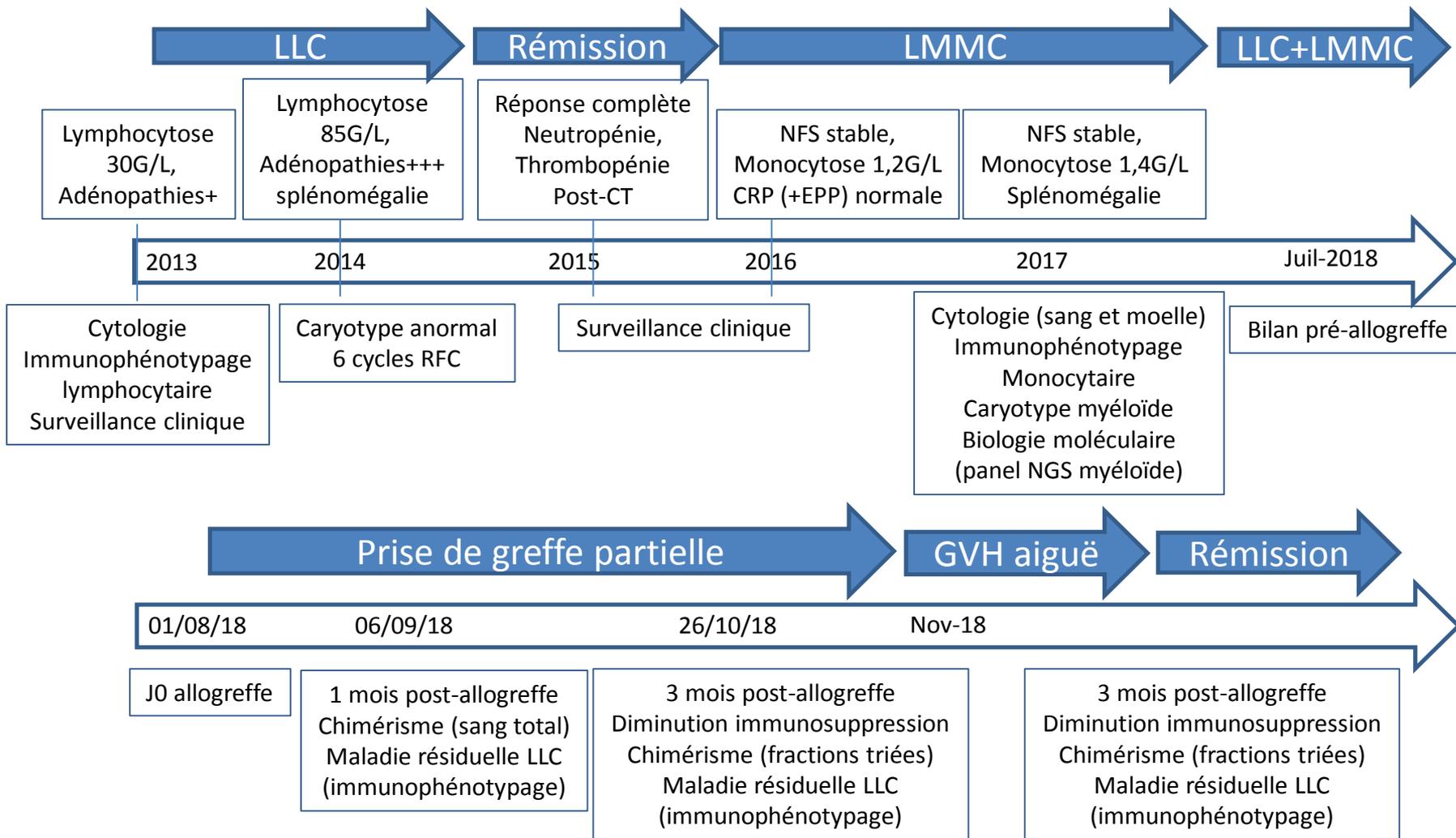
*Cytométrie en flux: Mr M. KHAZOUR*

*Biologie moléculaire: Mr C.GELLA*

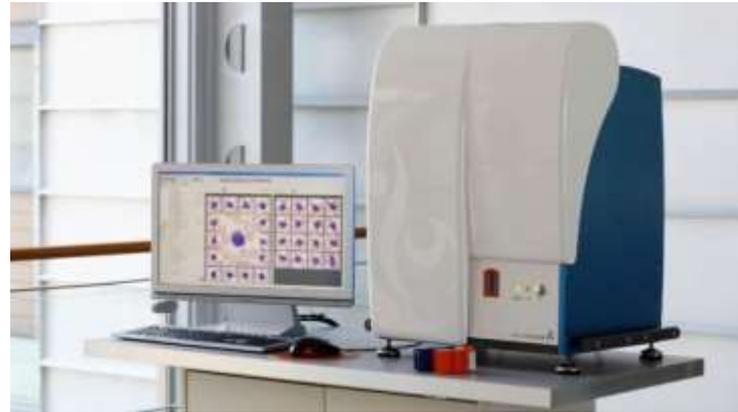
*Biologistes: Drs A. ARBAB, V.SAADA, C. MARZAC*

# SCENARIO

co-écrit avec Mr B. né en 1957



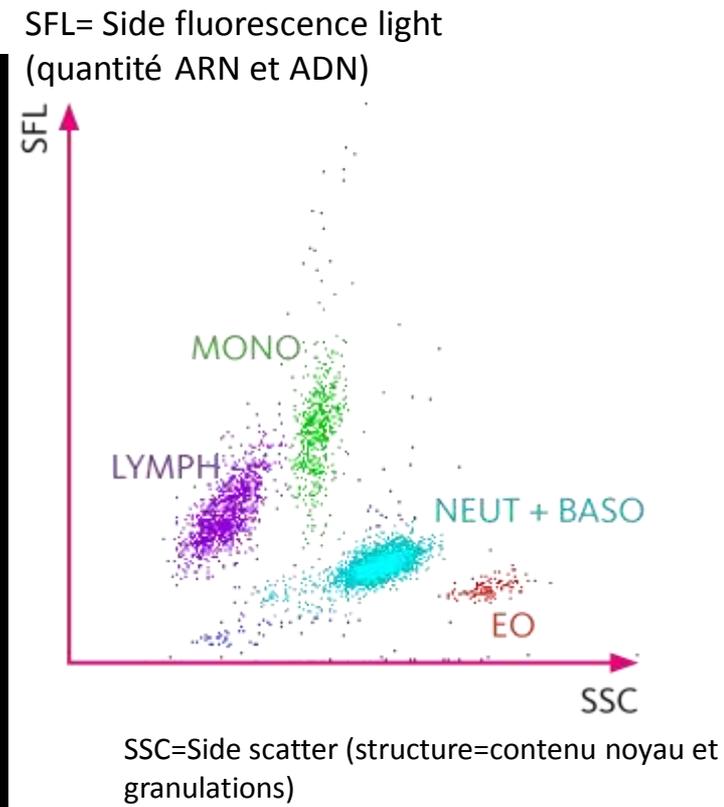
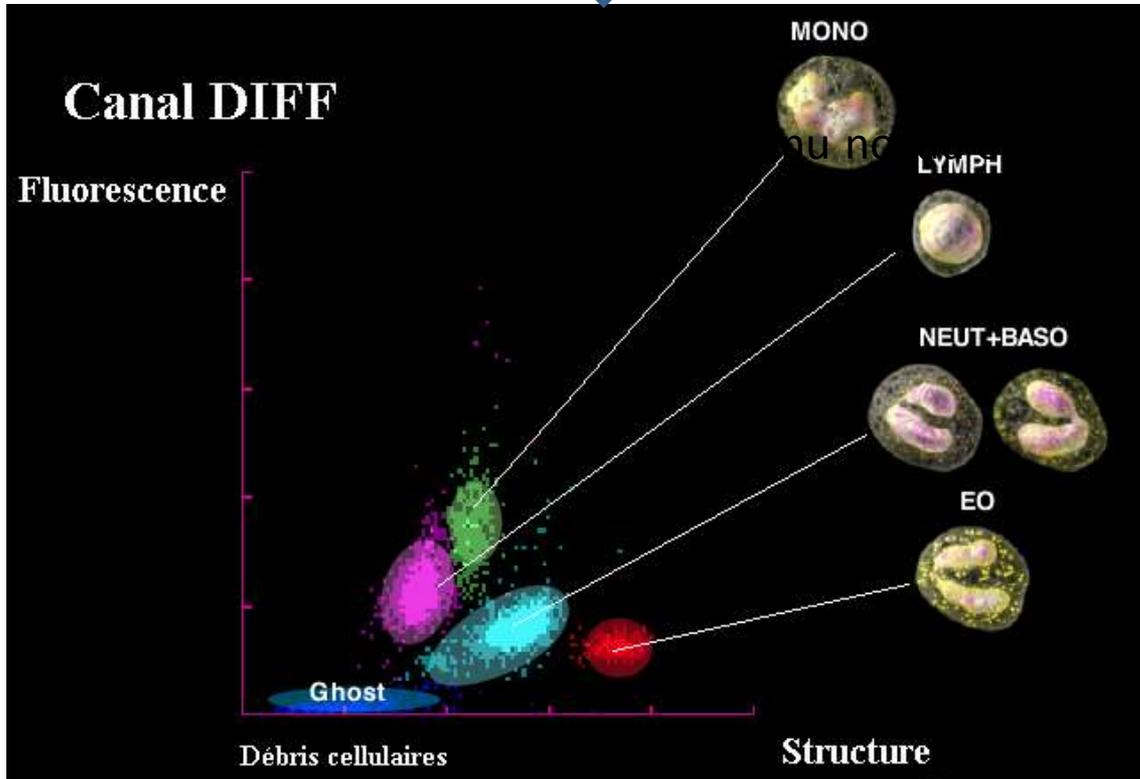
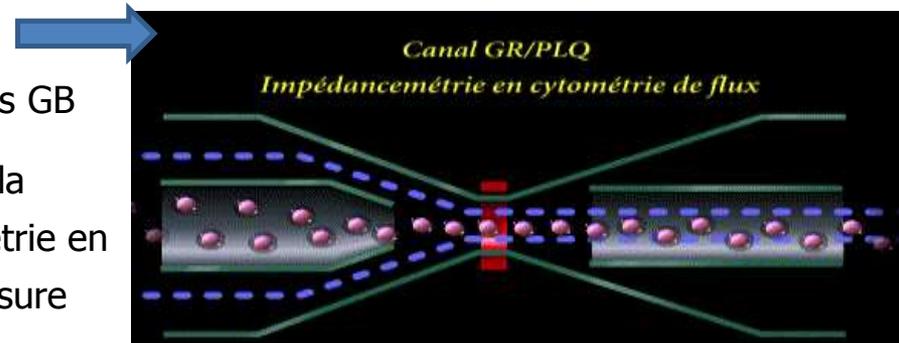
## 2013- exploration d'une hyperleucocytose 30G/L



Chaînes XN avec/sans « scanner » de lames intégré

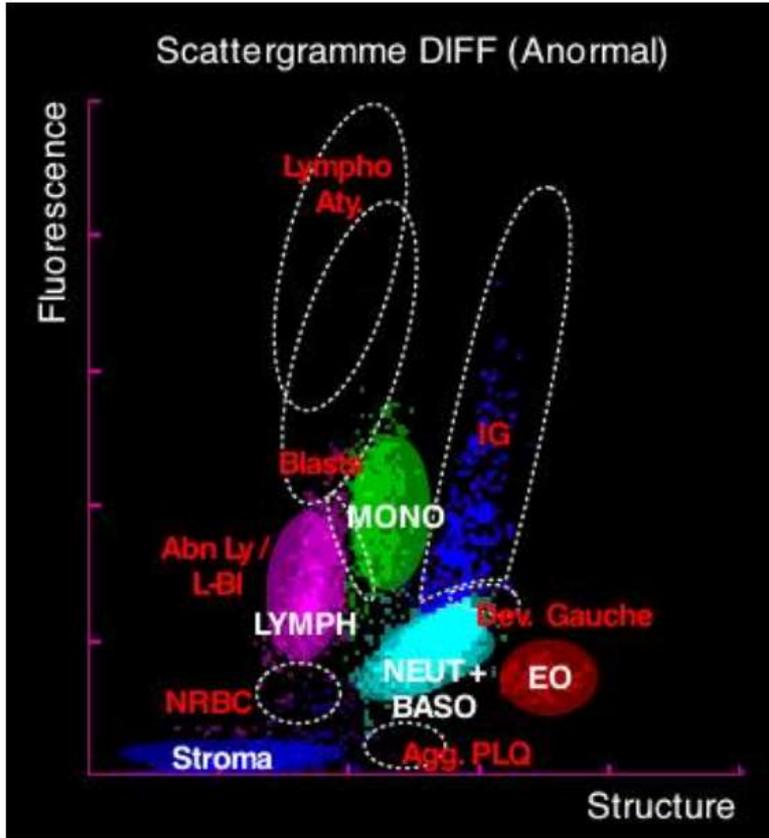
# Rappel technologique-Sysmex XN- analyse des leucocytes

- ❖ Quantification des populations par impédance
- ❖ Lyse GR et plaquettes pour le comptage et l'analyse des GB
- ❖ 2<sup>ème</sup> comptage des GB sur le Canal DIFF et analyse de la formule leucocytaire: caractérisation des GB par cytométrie en flux: fluorescence avec fluorochrome/ ADN et ARN, mesure de la diffraction du laser à 3 angles permet de classer les sous populations

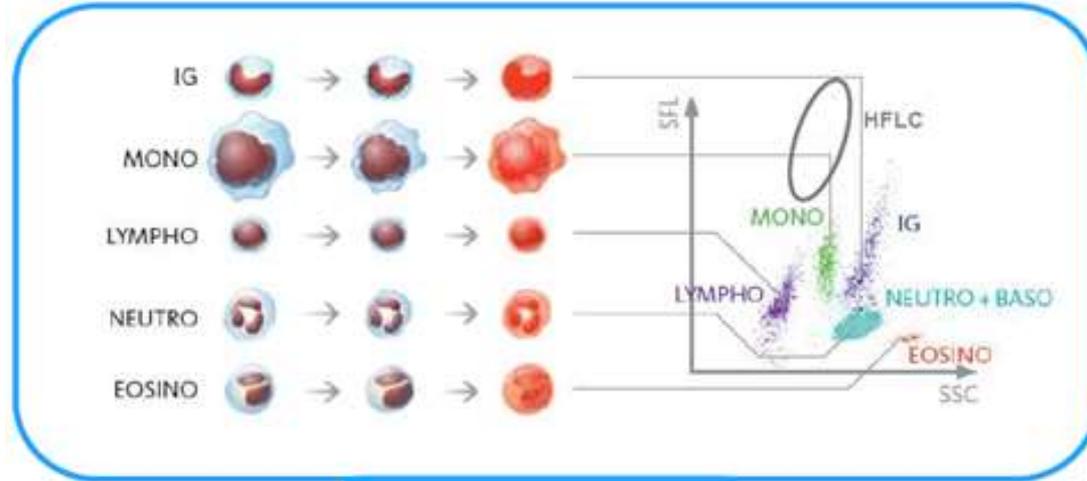


# POPULATIONS ANORMALES

## SYSMEX-XE



## SYSMEX-XN



DEUXIEME COMPTAGE DES LEUCOCYTES.

FORMULE LEUCOCYTAIRE EN 8 PARAMÈTRES DONT:

- IG (myélémie),
- HFLC (cellules mononuclées à fluorescence élevée),
- **Neutro-SSC** (indice de granularité des Neutro aide au diagnostic LMMC, MDS)

# PRINCIPE DU LECTEUR DE LAMES AUTOMATISE –DM-Cellavision



YouCut\_20191126\_003301561.mp4

<http://dl.free.fr/wH5KiOq59>



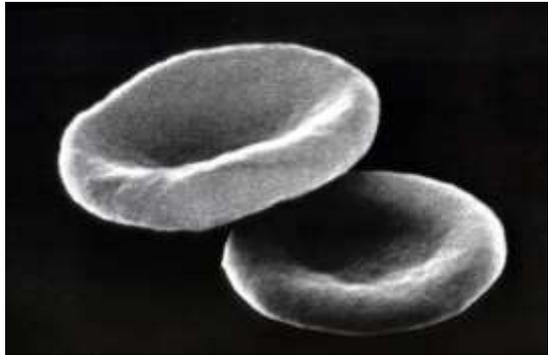
EXISTE EN VERSION CHAINEE – LECTURE AUTOMATISEE (XN9000)

## POINTS FORTS

- ❖ Pré-classement des cellules
- ❖ Archivage des images Evite la relecture de lames
- ❖ Cellulothèque personnalisée à partir de cas pathologiques
- ❖ Formation continue, habilitation, échanges
- ❖ Possibilité de travail à distance/postes déportés
- ❖ Continuité de service, travail en multisite

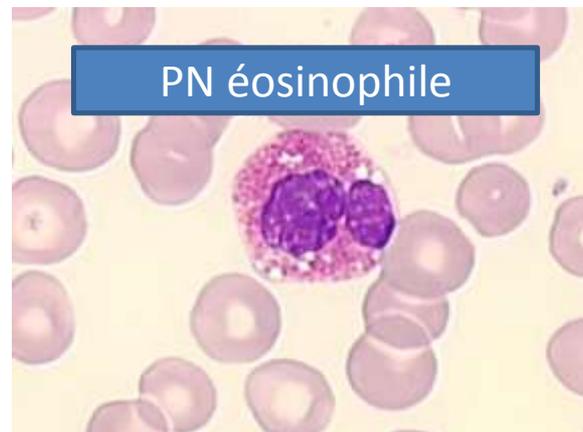
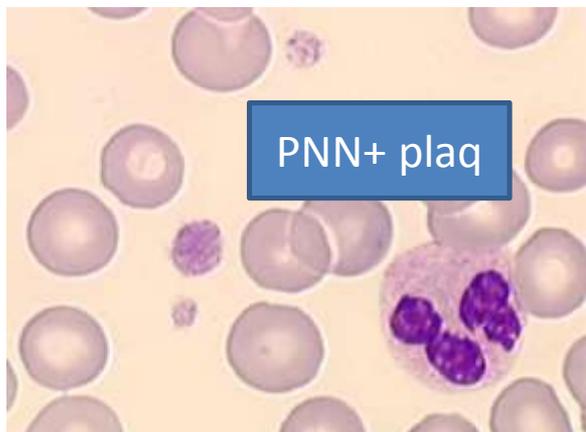
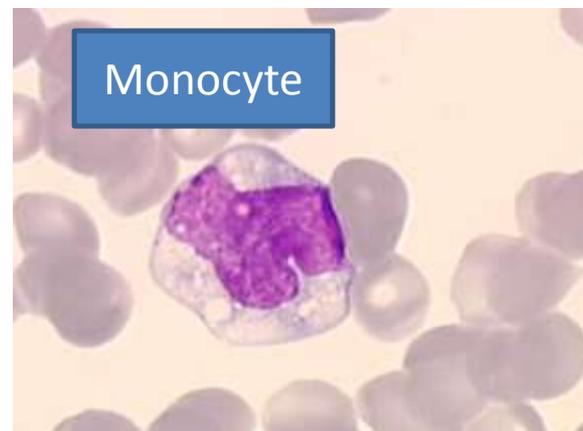
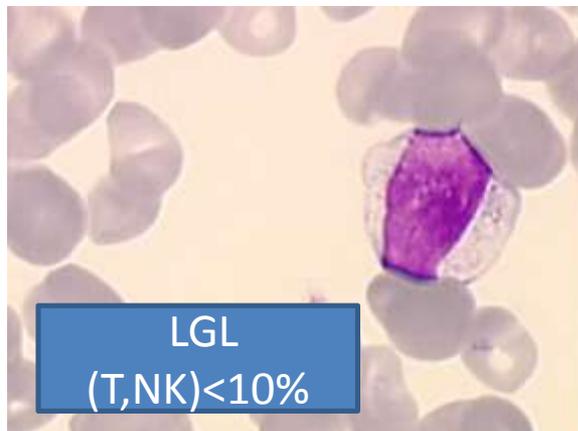
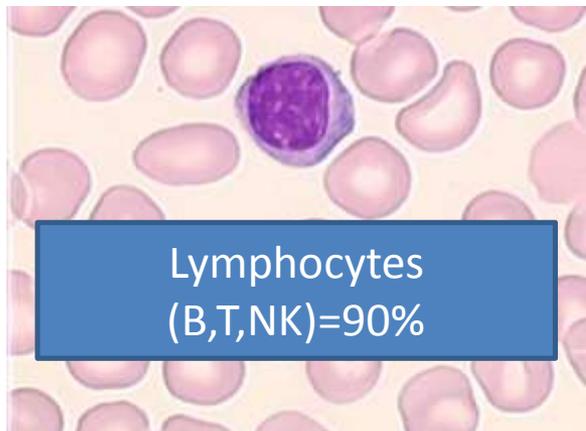
## POINTS SENSIBLES

- ❖ Vue partielle du frottis
- ❖ Exigence Frottis mince



## Rappel morphologique

### Éléments normaux du sang périphérique



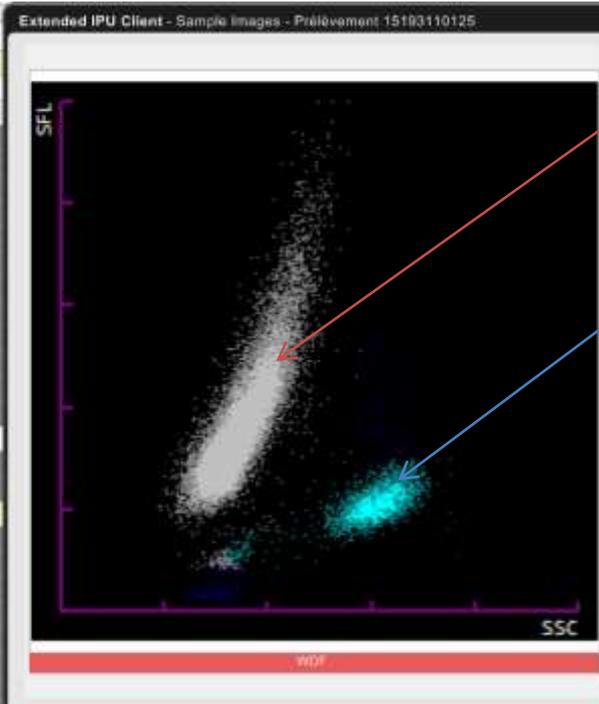
# .. REVENONS à Mr B

Hyperlymphocytose: 30 G/L  
Reste de la NFS: normal

Formule rejetée (XN)

Graphe analyseur

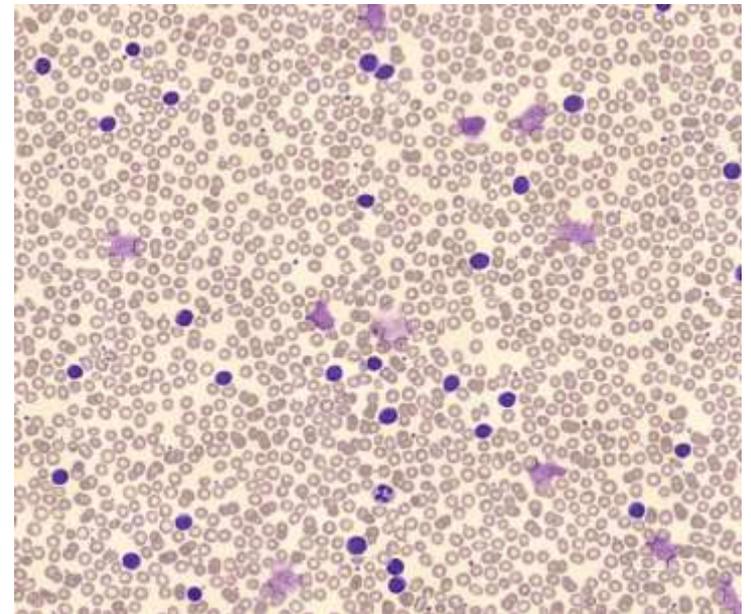
Reun	Dema	Run	Analyse	Résultat	C	Unité
<b>DIFF Profile</b>						
I	1		NEUT%	10,2		%
I	1		NEUT#	3,83		10 <sup>9</sup> /L
I	1		LYMP%	— non m...		%
I	1		LYMP#	— non m...		10 <sup>9</sup> /L
I	1		MONO%	— non m...		%
I	1		MONO#	— non m...		10 <sup>9</sup> /L
I	1		EO%	0,0		%
I	1		EO#	0,01		10 <sup>9</sup> /L
I	1		BASO%	0,2		%
I	1		BASO#	0,08		10 <sup>9</sup> /L
R	1		IG%	0,0		%
R	1		IG#	0,00		10 <sup>9</sup> /L
A	1		HFLC#	0,28		10 <sup>3</sup> /µL
A	1		HFLC%	0,7		%
A	1		NE-SSC	157,7		ch
A	1		NRBC%	0,1		1000/c
A	1		NRBC#	0,02		10 <sup>3</sup> /µL
<b>Morphologie d...</b>						
R			NEUT (DM)%			%
R			NEUT (DM)#			10 <sup>9</sup> /L
R			EO%			%
R			EO#			10 <sup>9</sup> /L
R			BASO%			%
R			BASO#			10 <sup>9</sup> /L
R			LYMP%			%



Nuages Ly/Mono confluents  
formule microscopique requise

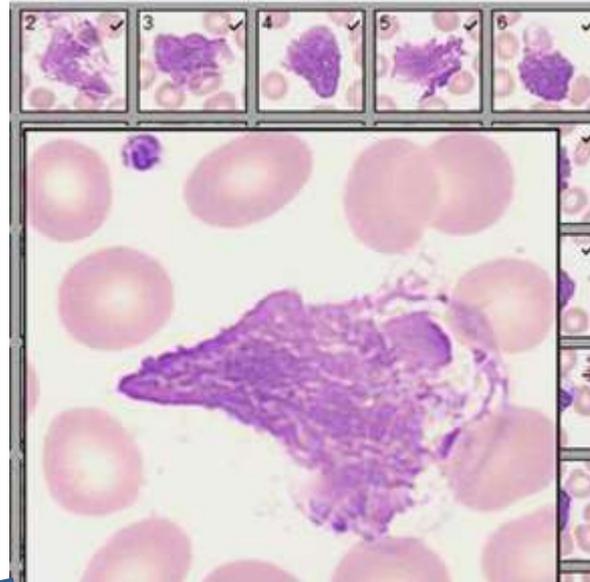
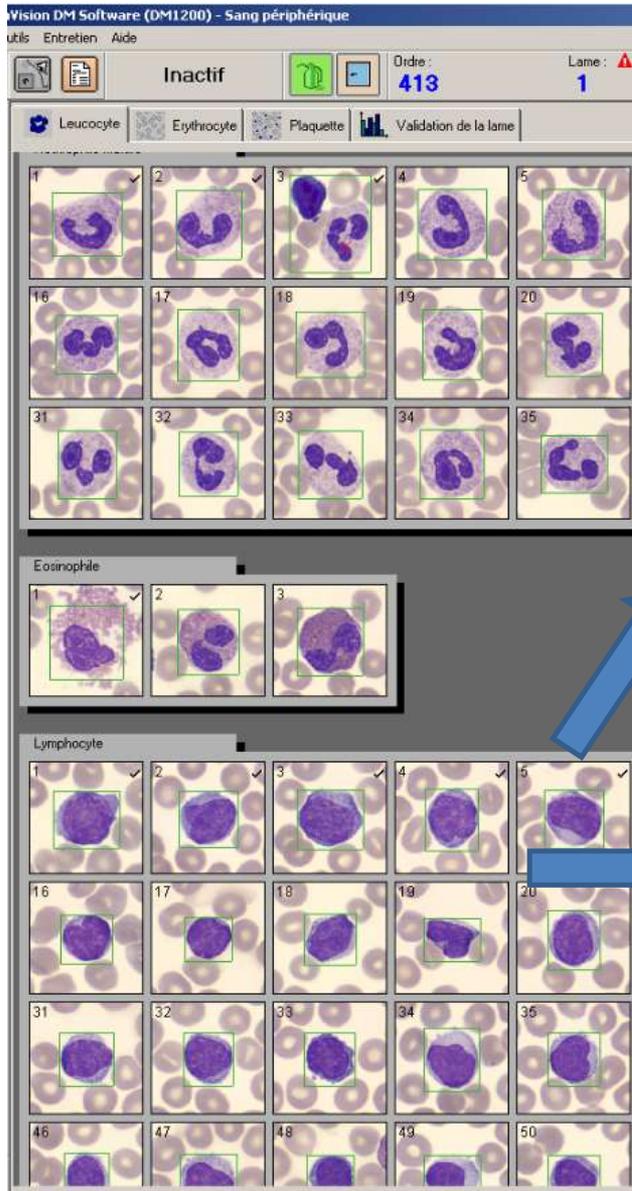
Nuage PNN bien séparé

Champ large(x10)-Cellavision DM1200

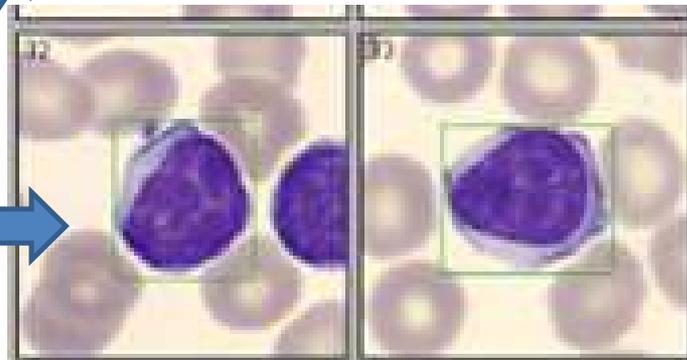
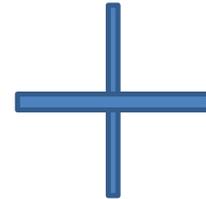


Ombres de Gümprécht(noyaux nus)

# ZOOM



Ombres de Gümprich =  
lymphocytes fragiles



Petits lymphocytes  
monomorphes à  
chromatine mottée  
d'aspect mature

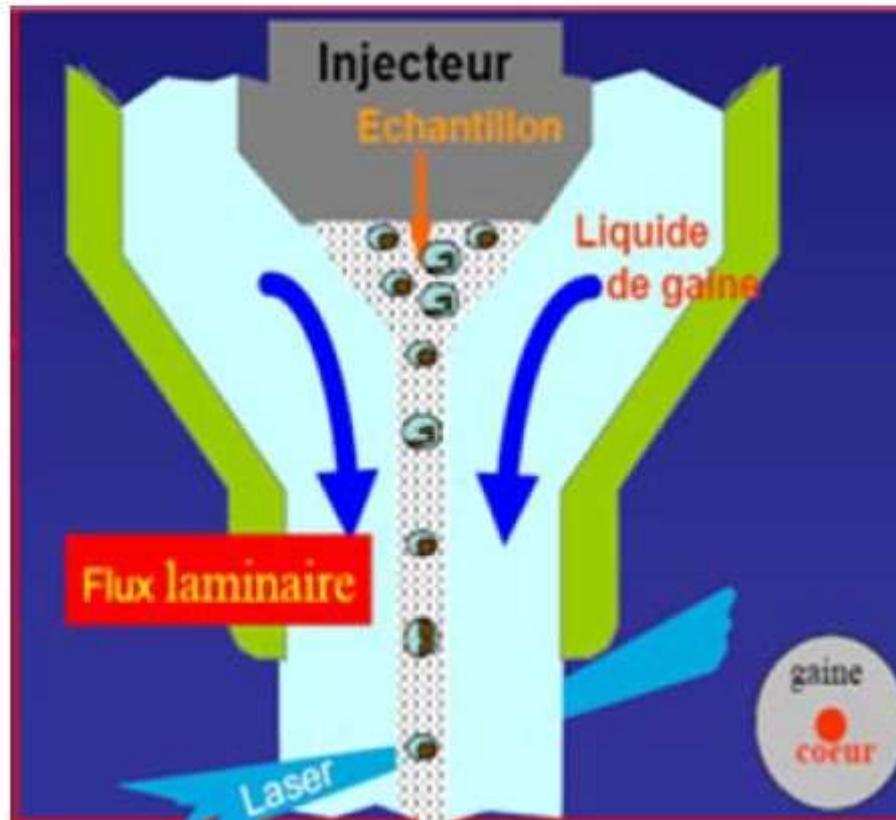
Aspect cytologique de LLC.....à confirmer par immunophénotypage



# Cytométrie en flux : Définition

- La **cytométrie en flux** est une technique biologique de mesure des cellules en suspension dans un liquide.
- Ces cellules sont entraînées par un **liquide de gaine** devant une source laser.
- Exposées à cette source lumineuse, elles émettent alors un **signal de diffraction** qui permet de discriminer différents types cellulaires en fonction des paramètres de taille et de structure.
- **Cytofluorométrie** (*Cyto* : cellule ; *fluoro* : fluorochrome ; *métrie* : mesure)
- Elles émettent également un signal de fluorescence appelé **autofluorescence** auquel se rajoute **le signal spécifique de fluorescence** émis par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes dans le cas de l'immunophénotypage des leucocytes.

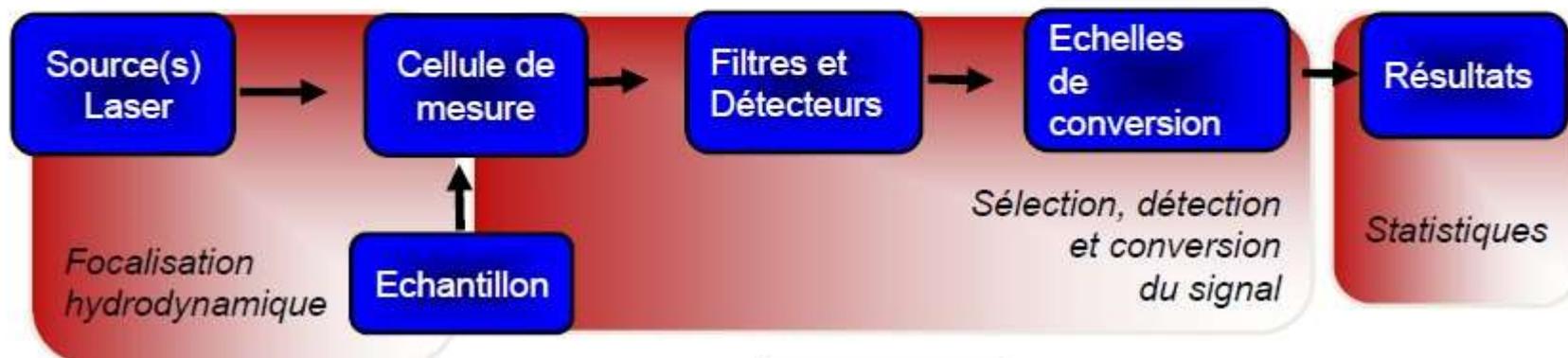
## Fluidique : Focalisation Hydrodynamique



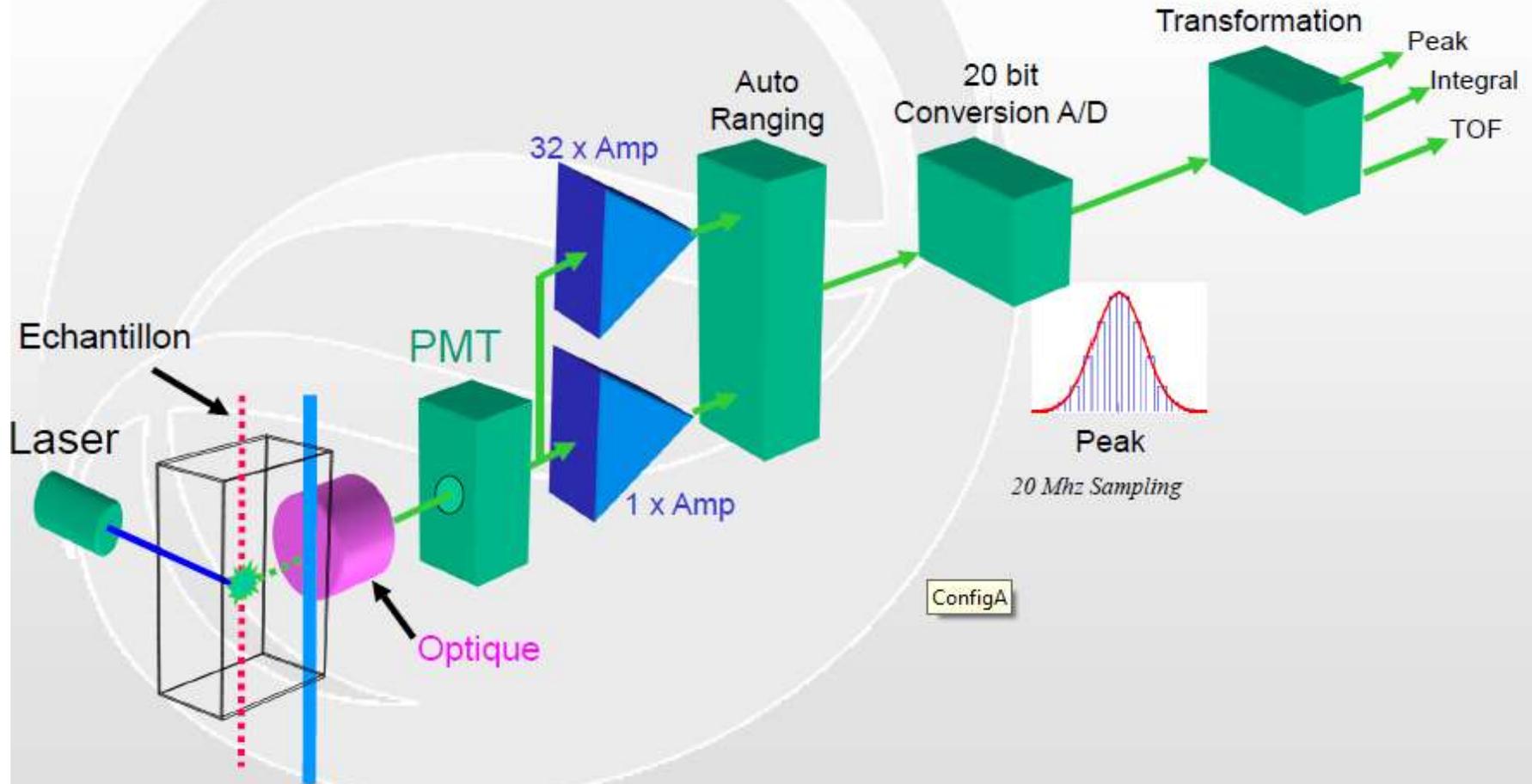
- Création d'un flux laminaire dans la cellule de mesure par **pressurisation du liquide de gaine**
- Injection de l'échantillon dans cette cellule de mesure par **pressurisation du tube échantillon**
- Le but est de faire passer les cellules l'une après l'autre au niveau de la zone d'analyse



## Les grandes étapes de l'analyse en cytométrie



# Traitement du signal : les grandes étapes



# Les fluorochromes tandem

*PC7 = PE-Cyanine 7*



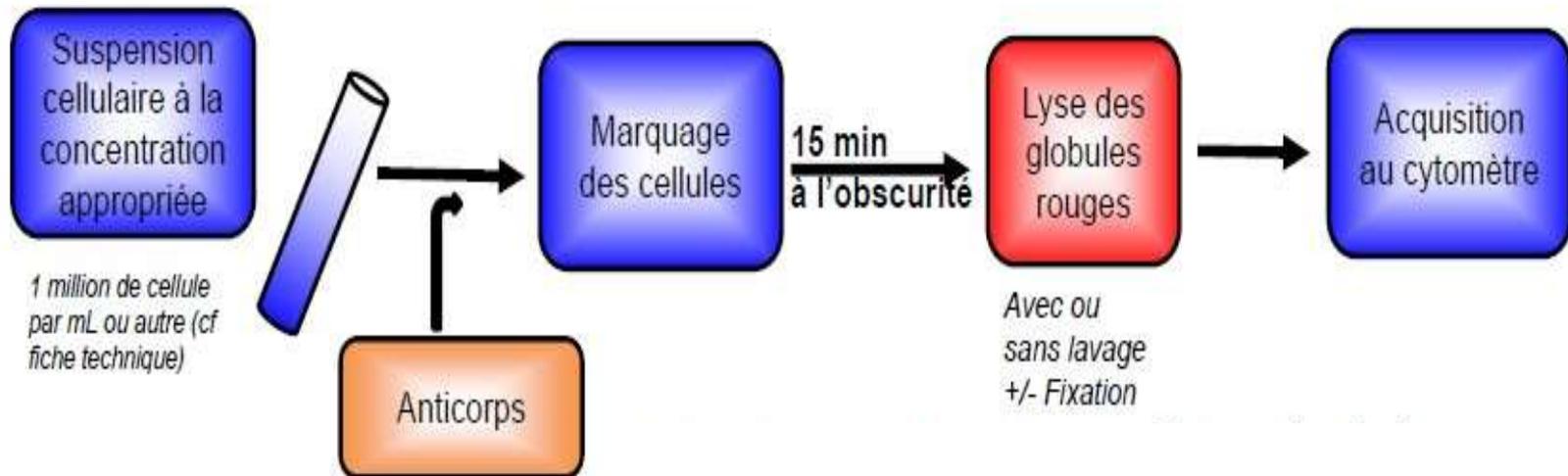
*APC AF750 = APC-Alexa Fluor 750*





# Préparation des échantillons

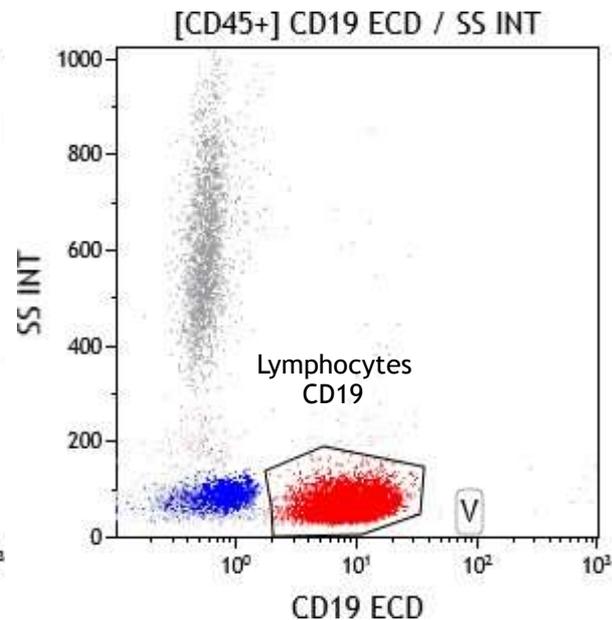
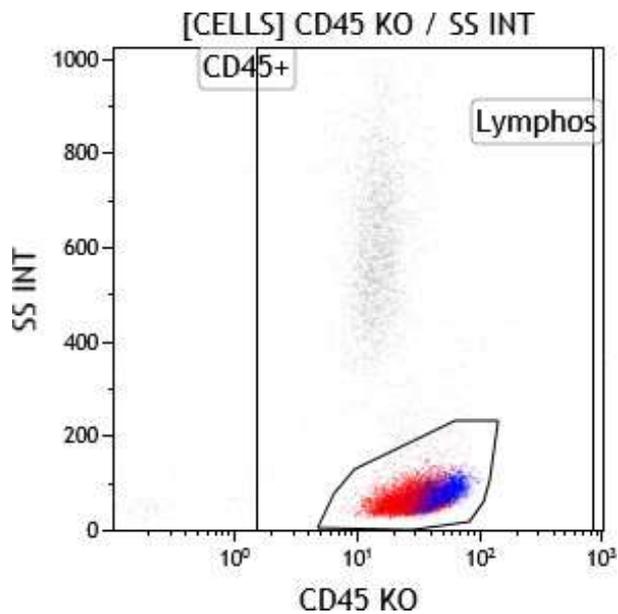
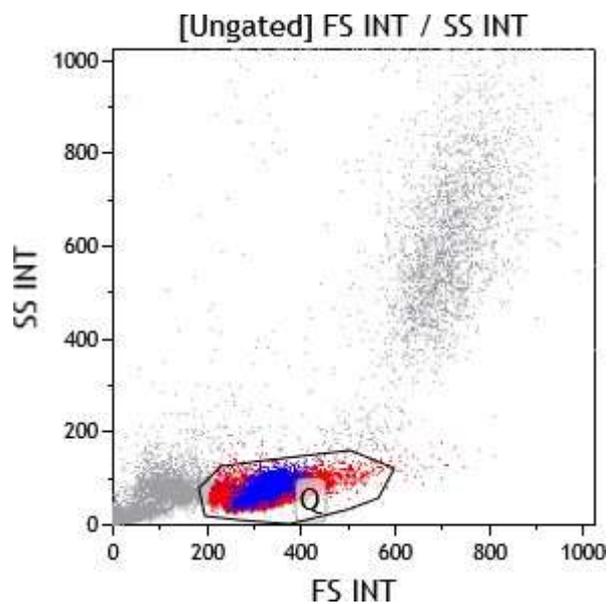
## Exemple de technique



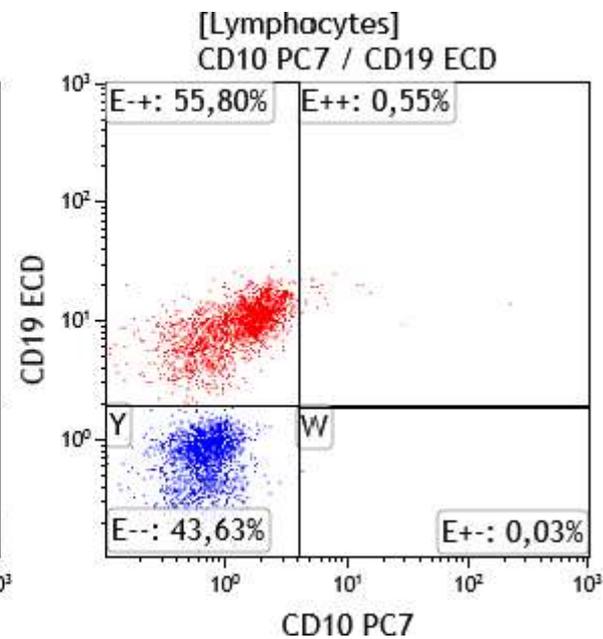
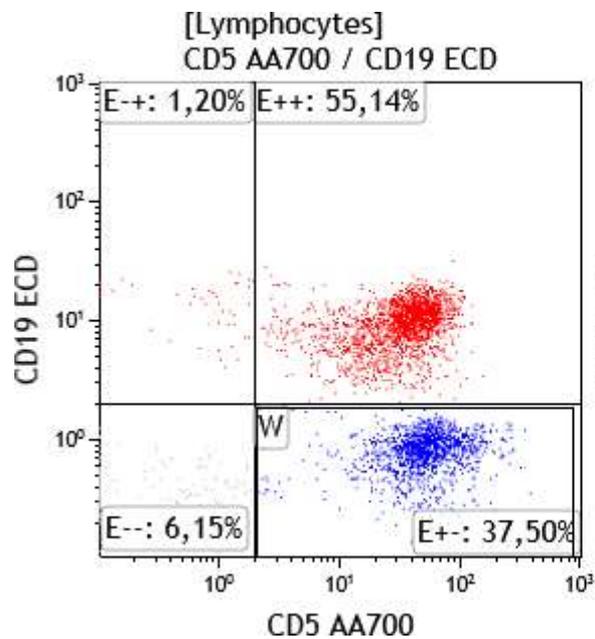
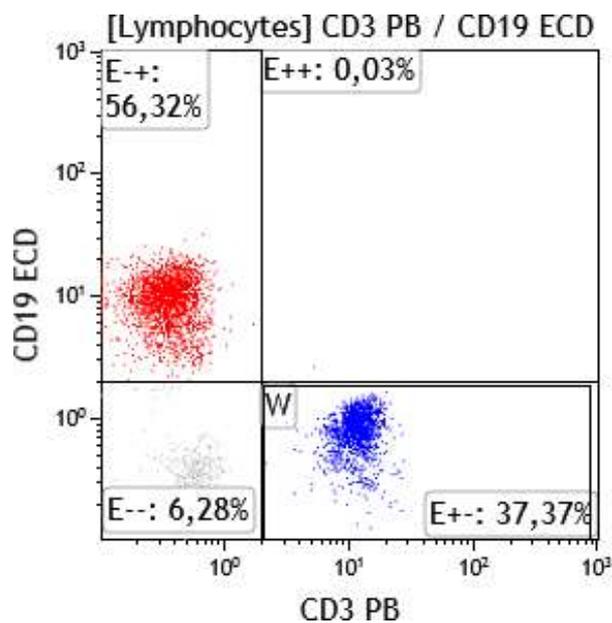
# Profil des marqueurs utilisés en cytométrie

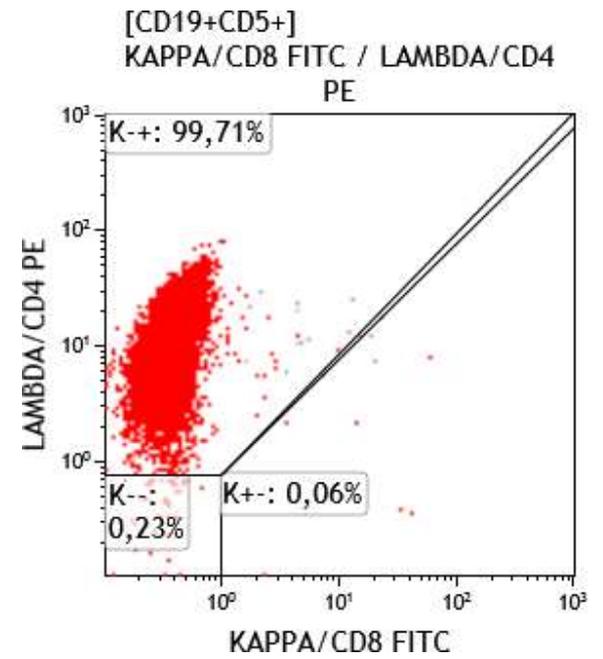
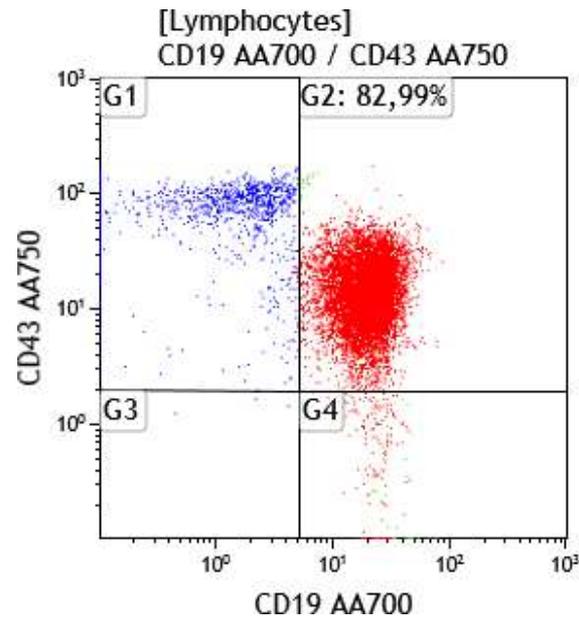
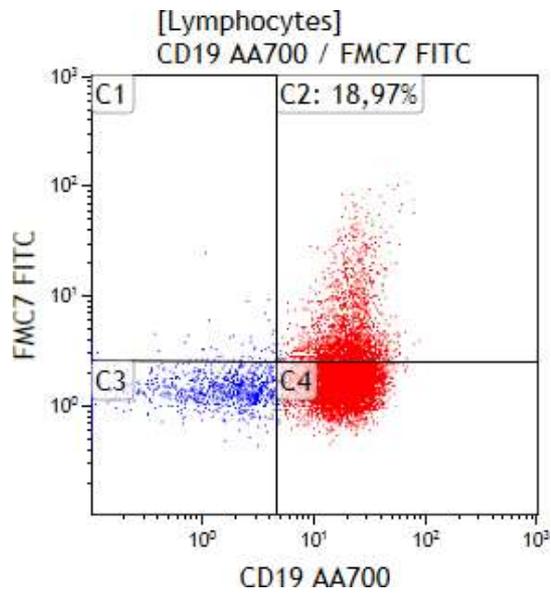
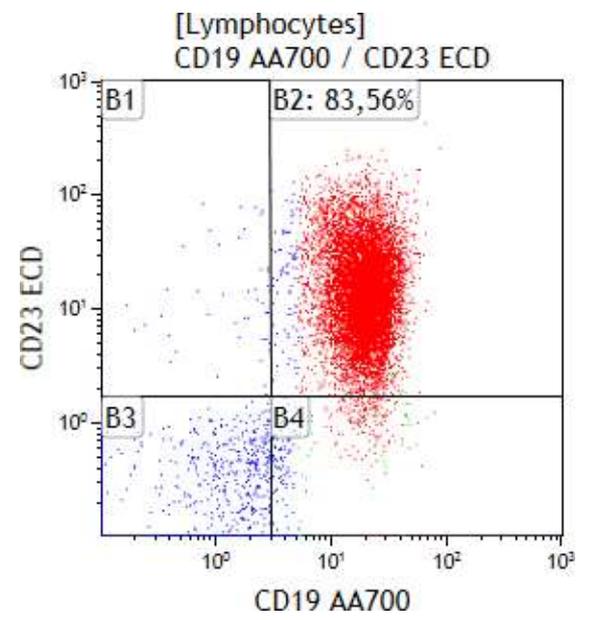
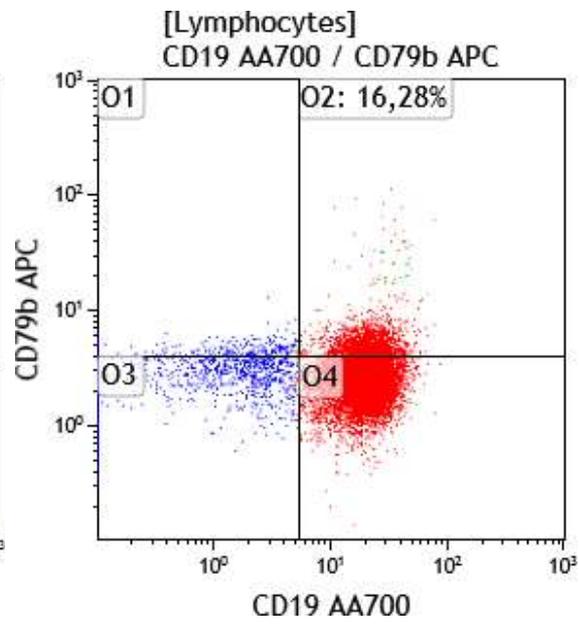
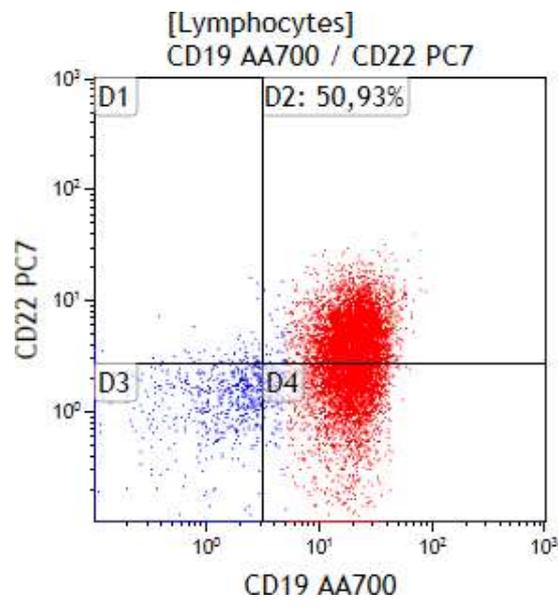
## Pour caractériser les hémopathies

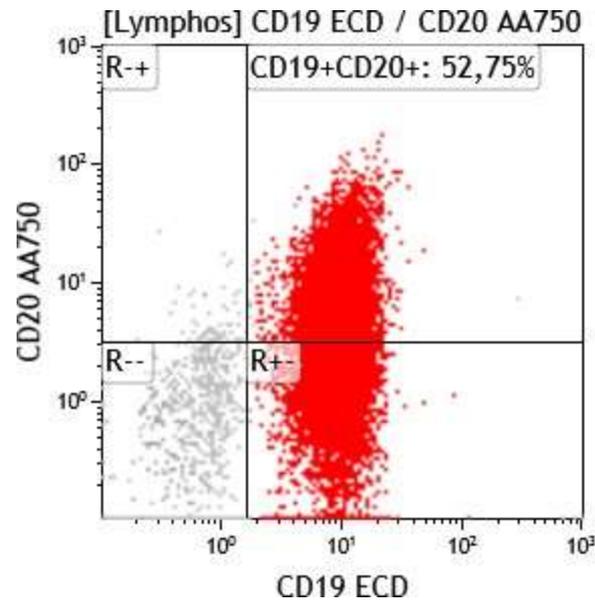
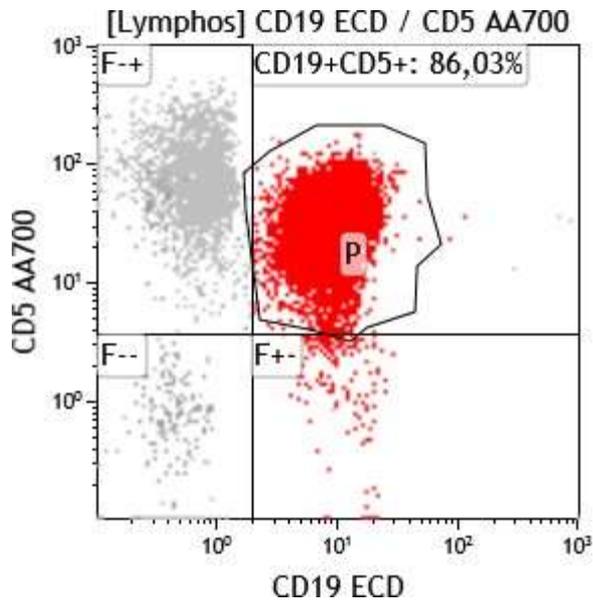
Marqueurs	Panleuco	Immaturité	Myéloïde	Lymphoïde B	Lymphoïde T
	CD45	CD34 HLA DR	CD13 CD33 CD117 MPO intra CD14 CD15 CD64 CD36 CD4	CD19 CD20 CD22 CD23 CD79a CD79b SIgM	CD1a CD2 CD3 CD4 CD5 CD7 CD8 TCR



## .. REVENONS à Mr B

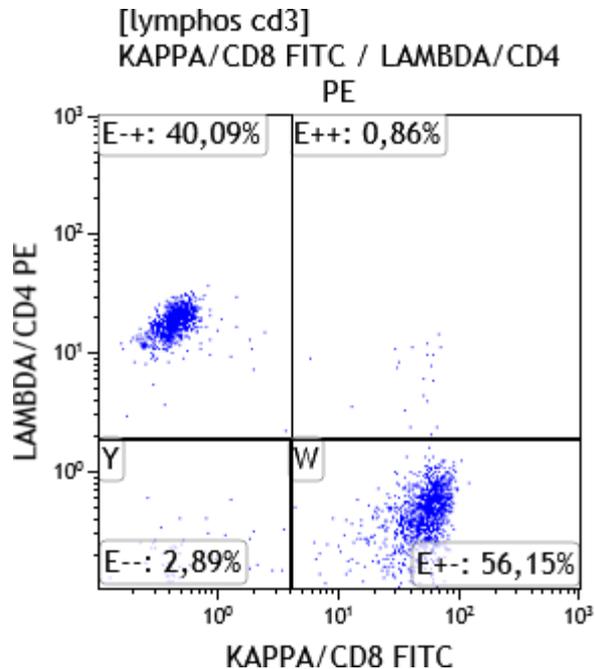






Score de Matutes  
 CD5+: 1 point  
 CD23+: 1 point  
 CD22 ou CD79B:  
 faibles ou  
 négatifs: 1 point  
 FMC7-: 1 point  
 IgS surface faible:  
 1 point

Mr B: score de  
 Matutes à 4/5 Si>3:  
 diagnostic de LLC



**Diagnostic retenu:**  
 Leucémie Lymphoïde Chronique

# Immunophénotypage des lymphomes-B « circulants »

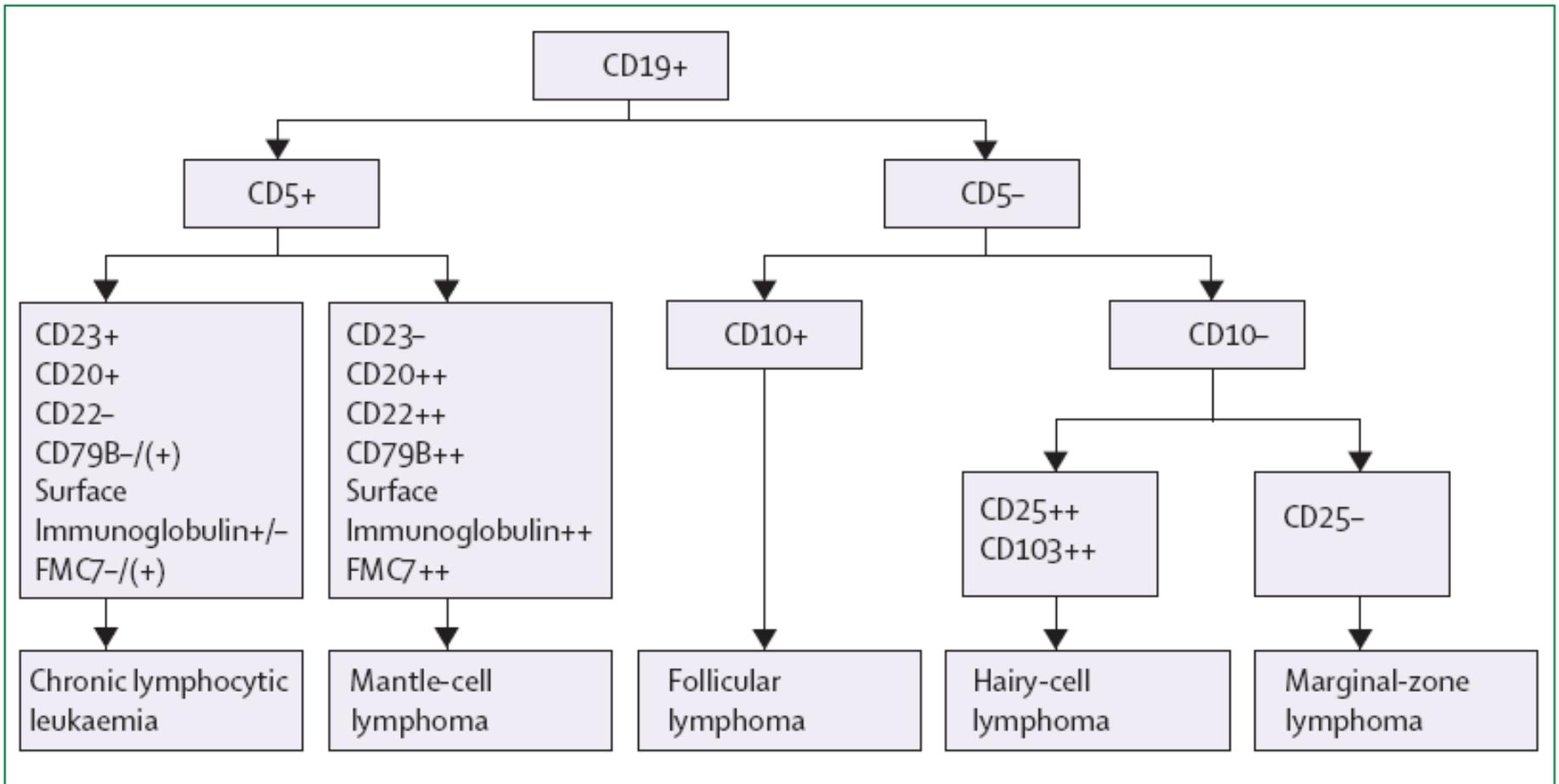
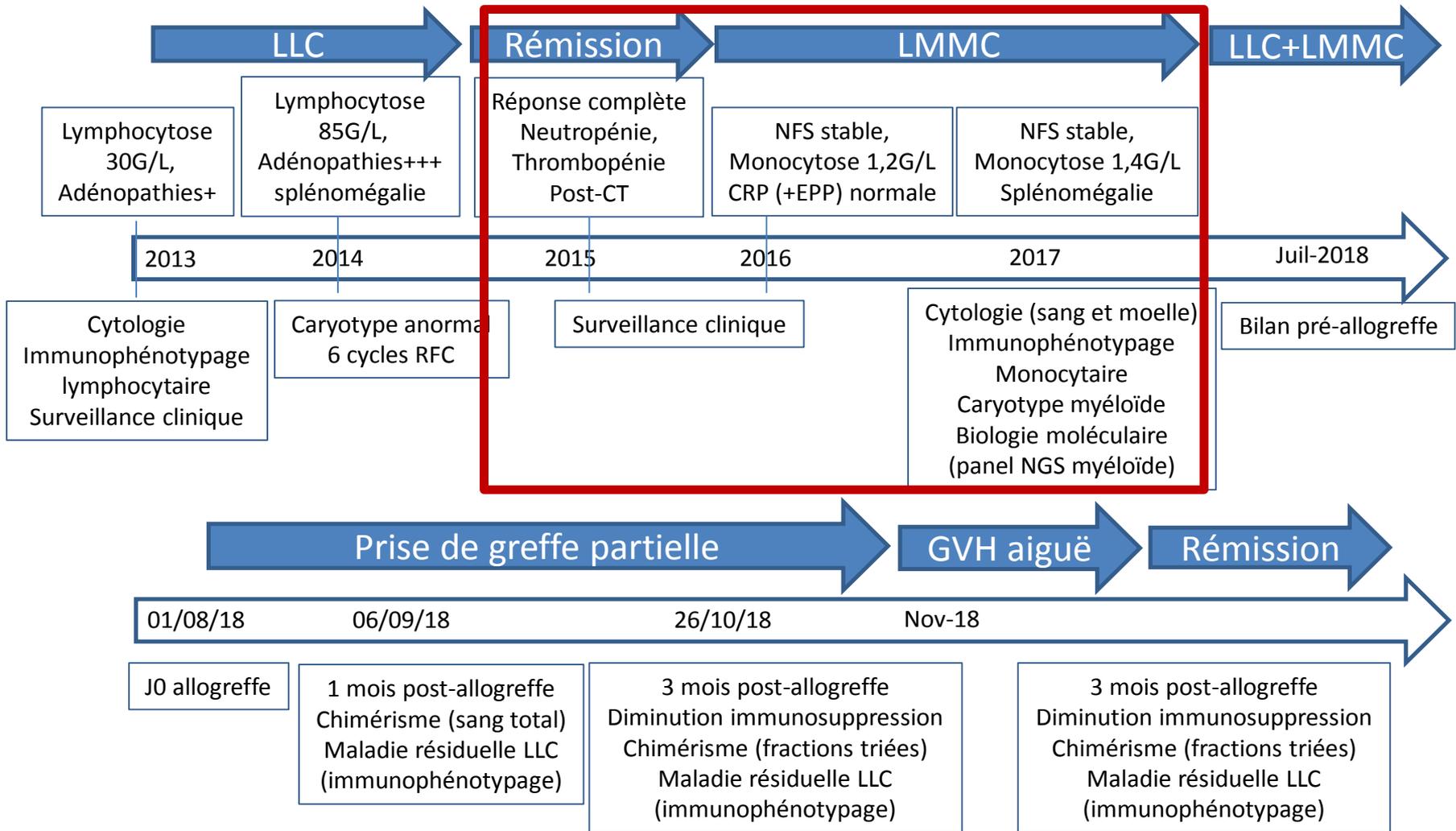


Figure: Differential diagnosis of CD19+ lymphocytosis

# SCENARIO

co-écrit avec Mr B. né en 1957



# NFS du 30.08.2017

## Thrombopénie, absence de lymphocytose

### Règles

Préana - Phénotypage demandé par le clinicien -> Lame

PLT basses + inconnu --> Lame

### Commentaires numération

Absence d'agrégats plaquettaires sur le frottis[2]

Présence de monocytes dystrophiques[2]

Formule automate vérifiée sur frottis[2]

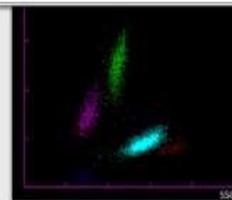
### Commentaires validation

### Flags analyseurs

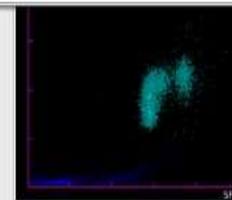
Monocytosis[1]

STAIN OK

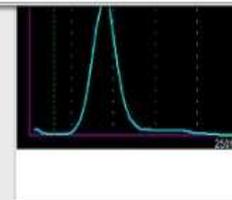
CBC										
I	1	WBC	6,65		10 <sup>9</sup> /L	⚠	30/08/2017 10:41:40	Validé	4,23	63
I	1	RBC	4,76		10 <sup>12</sup> /L		30/08/2017 10:41:40	Validé	4,62	63
I	1	HGB	14,5		g/dl		30/08/2017 10:41:40	Validé	14,3	63
I	1	HCT	42,4		%		30/08/2017 10:41:40	Validé	40,9	63
I	1	VGM	89,1		fl		30/08/2017 10:41:40	Validé	88,5	63
I	1	TCMH	30,5		pg		30/08/2017 10:41:40	Validé	31,0	63
I	1	CCMH	34,2		g/dl		30/08/2017 10:41:40	Validé	35,0	63
I	1	RDW-CV	14,5		%		30/08/2017 10:41:40	Validé	13,8	63
A	1	RDW-SD	46,5		fl		30/08/2017 10:41:40	Validé	44,0	63
I	1	PLT	73		10 <sup>9</sup> /L	-	30/08/2017 10:41:40	Validé	52 (A télép...	63
I	1	VPM	11,0		fl		30/08/2017 10:41:40	Validé	10,1	63
A	1	P-LCR	33,7		%		30/08/2017 10:41:40	Validé	27,9	63
I	1	IDP	14,7		fl		30/08/2017 10:41:40	Validé	12,1	63
DIFF Profile										
I	1	NEUT%	63,0		%		30/08/2017 10:41:40	Validé	52,5	63
I	1	NEUT#	4,19	On...	10 <sup>9</sup> /L	⚠	30/08/2017 10:41:40	Validé	2,22 (On H...	63
I	1	LYMPH%	12,8		%		30/08/2017 10:41:40	Validé	15,6	63



WDF[1]



WNR[1]



RBC[1]



PLT[1]

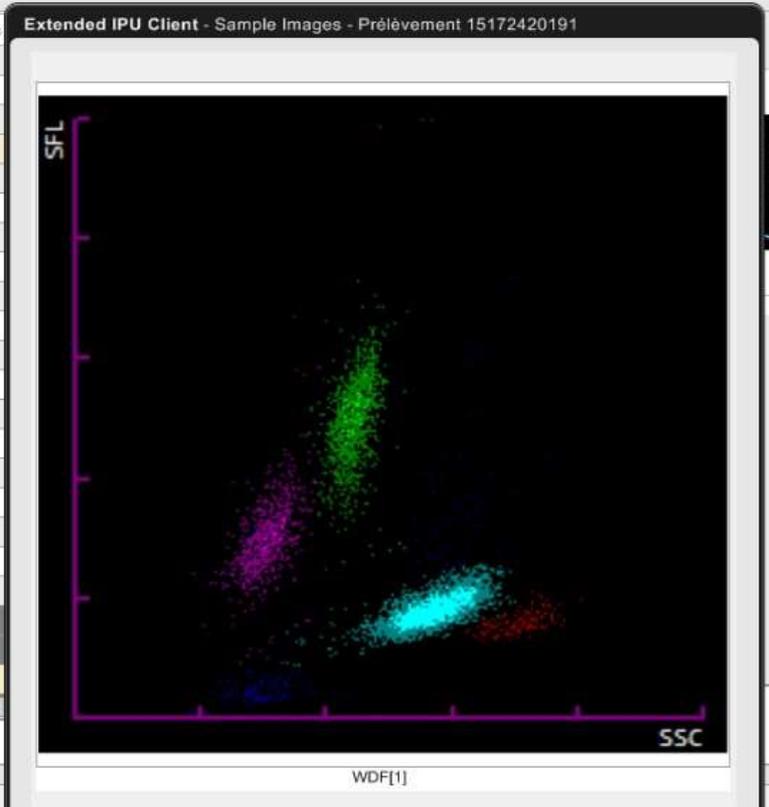


WDF(FSC)[1]

# NFS du 30,08,2017 (XN-1000): monocytose + thrombopénie

Règles Commentaires validation Flags analyseurs  
 Préana - Phénotypage demandé par le clinicien -> Lame Monocytosis[1]

Rerun	Dema	Run	Analyse	Résultat	C	Unité	Flag n	Delta	Date/heure	Etat an	Résultat préc	Age préc
I		1	VPM	11,0		fl			30/08/2017 10:41:40	Validé	10,1	63
A		1	P-LCR	33,7		%			30/08/2017 10:41:40	Validé	27,9	63
I		1	IDP	14,7		fl			30/08/2017 10:41:40	Validé	12,1	63
<b>DIFF Profile</b>												
I		1	NEUT%	63,0		%			30/08/2017 10:41:40	Validé	52,5	63
I		1	NEUT#	4,19	On...	10 <sup>9</sup> /L		⚠	30/08/2017 10:41:40	Validé	2,22 (On H...	63
I		1	LYMPH%	12,8		%			30/08/2017 10:41:40	Validé	15,6	63
I		1	LYMPH#	0,85		10 <sup>9</sup> /L			30/08/2017 10:41:40	Validé	0,66	63
I		1	MONO%	21,2		%			30/08/2017 10:41:40	Validé	27,0	63
I		1	MONO#	1,41		10 <sup>9</sup> /L	+		30/08/2017 10:41:40	Validé	1,14	63
I		1	EO%	2,7		%			30/08/2017 10:41:40	Validé	4,7	63
I		1	EO#	0,18		10 <sup>9</sup> /L			30/08/2017 10:41:40	Validé	0,20	63
I		1	BASO%	0,3		%			30/08/2017 10:41:40	Validé	0,2	63
I		1	BASO#	0,02		10 <sup>9</sup> /L			30/08/2017 10:41:40	Validé	0,01	63
R		1	IG%	0,0		%			30/08/2017 11:36:15	Validé	0,0	63
R		1	IG#	0,00		10 <sup>9</sup> /L			30/08/2017 11:36:15	Validé	0,00	63
A		1	HFLC#	0,01		10 <sup>3</sup> /μL			30/08/2017 10:41:40	Validé	0,00	63
A		1	HFLC%	0,2		%			30/08/2017 10:41:40	Validé	0,0	63
A		1	NE-SSC	147,7		ch			30/08/2017 10:41:40	Validé	148,1	63
A		1	NRBC%	0,0		/100 le...			30/08/2017 10:41:40	Annu...		
A		1	NRBC#	0,00		10 <sup>3</sup> /μL			30/08/2017 10:41:40	Annu...		
<b>Morphologie d...</b>												



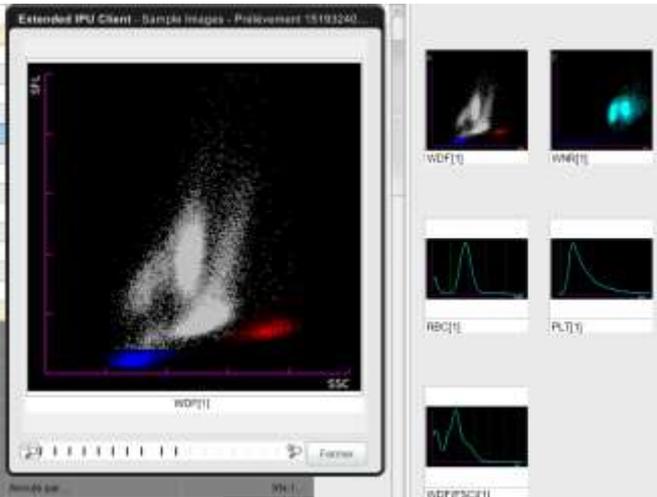
MY\_GB08

**Monocytose et Dysplasie ou thrombopénie**  
**Lame pour suspicion diagnostic LMMC**

Pour un patient inconnu ou avec un résultat supérieur à 90 jours, faire une lame si les monocytes sont compris entre 1 000 et 2000/μl et si le NE-SSC des neutrophiles est compris entre 141 et 151 avec des plaquettes inférieures à 100 000/μl, ou si le SCC des neutrophiles est inférieur à 141

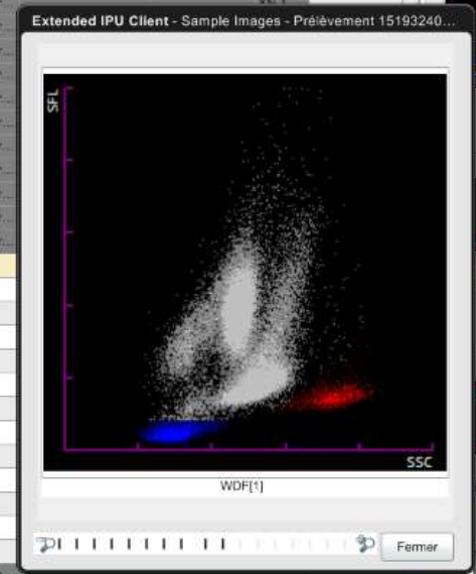
# LMMC: cytologie typique sur analyseur XN

Analyse	Résultat	C	Unité	Flag ref.	Delta	Date/heure
<b>CBC</b>						
WBC	56,94		10 <sup>9</sup> /L	Haute		20/11/2019
RBC	2,91		10 <sup>12</sup> /L			20/11/2019
HGB	8,8		g/dl	Basse		20/11/2019
HCT	26,9		%			20/11/2019
VDW	91,4		f			20/11/2019
TCMH	30,2		pg			20/11/2019
CCMH	33,1		pg			20/11/2019
RDW-CV	14,0		%			20/11/2019
RDW-SD	49,4		f			20/11/2019
PLT	423		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019
MPV	11,8		f			20/11/2019
P-LCR	35,0		%			20/11/2019
IPF	13,9		f			20/11/2019
<b>DIFF Profile</b>						
NEUT%	—	%				20/11/2019
NEUT#	—	10 <sup>9</sup> /L				20/11/2019
LYMPH%	—	%				20/11/2019
LYMPH#	—	10 <sup>9</sup> /L				20/11/2019
MONO%	—	%				20/11/2019
MONO#	—	10 <sup>9</sup> /L				20/11/2019
EO%	2,5	%				20/11/2019
EO#	1,43	10 <sup>9</sup> /L	Haute			20/11/2019
BASO%	0,2	%				20/11/2019
BASO#	0,12	10 <sup>9</sup> /L +				20/11/2019
IG%	—	%				20/11/2019
IG#	—	10 <sup>9</sup> /L				20/11/2019
HFLC#	0,08	10 <sup>9</sup> /L				20/11/2019
HFLC%	0,1	%				20/11/2019
NE-SSC	135,3	ch	Basse			20/11/2019
NRBC%	0,0	/100				20/11/2019
NRBC#	0,00	10 <sup>6</sup> /L				20/11/2019

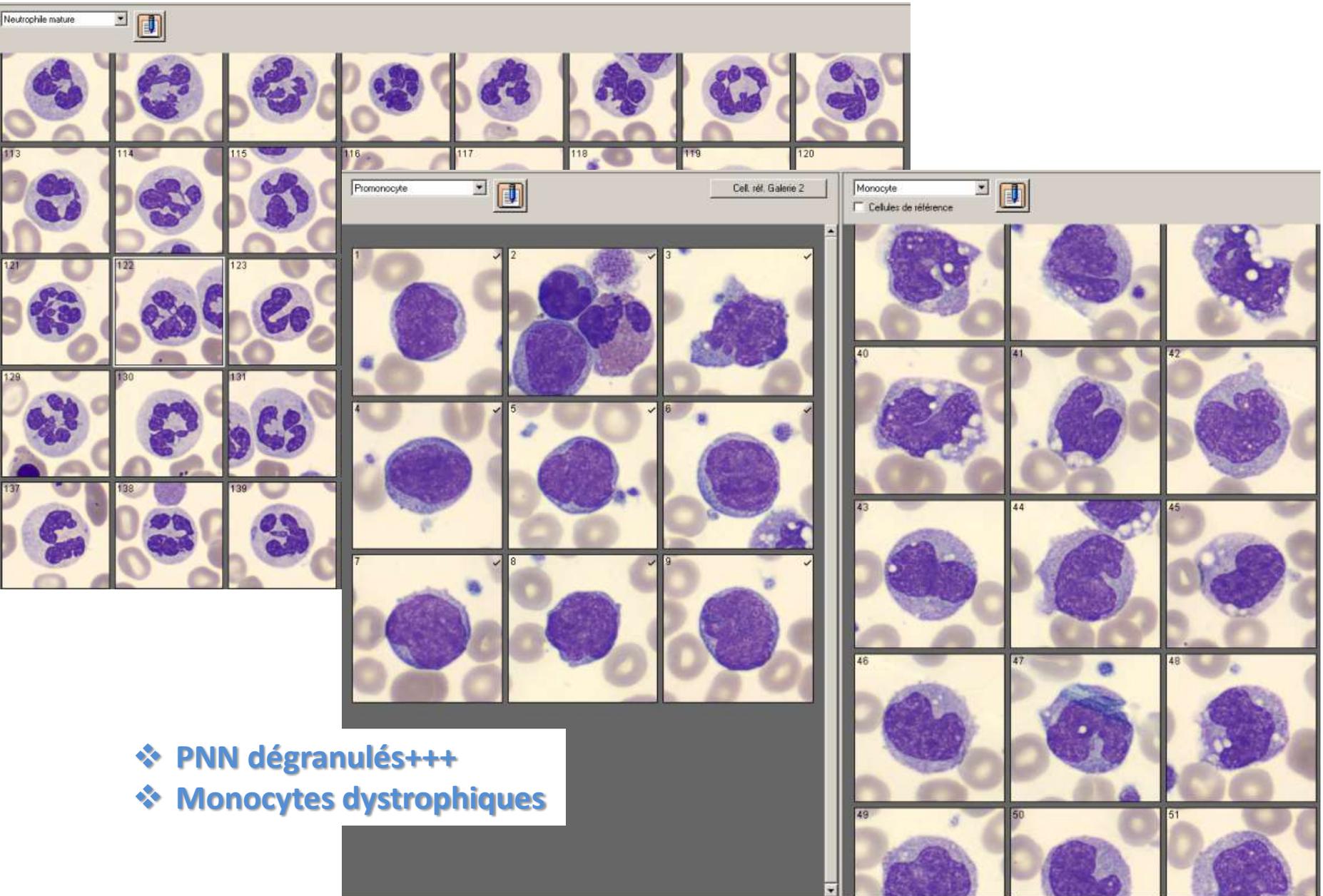


- ❖ myélémie et monocytose
- ❖ NE-SSC bas (138)

Rerun	Demande	Run	Analyse	Résultat	C	Unité	Flag ref.	Delta	Date/heure	Etat analyse	Résultat précédent 1	Age précédent 1	Partner
I	1	1	LYMPH#	— no...		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Annulé par...			XN-1...
I	1	1	MONO%	— no...		%			20/11/2019...	Annulé par...			XN-1...
I	1	1	MONO#	— no...		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Annulé par...			XN-1...
I	1	1	EO%	2,5		%			20/11/2019...	Annulé par...			
I	1	1	EO#	1,40		10 <sup>9</sup> /L	Haute...		20/11/2019...	Annulé par...			
I	1	1	BASO%	0,2		%			20/11/2019...	Annulé par...			
I	1	1	BASO#	0,12		10 <sup>9</sup> /L +			20/11/2019...	Annulé par...			
A	1	1	IG%	— no...		%			20/11/2019...	Annulé par...			
A	1	1	IG#	— no...		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Annulé par...			
A	1	1	HFLC#	0,08		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Annulé par...			
A	1	1	HFLC%	0,1		%			20/11/2019...	Annulé par...			
A	1	1	NE-SSC	135,3		ch	Basse...		20/11/2019...	Annulé par...			
A	1	1	NRBC%	0,0		/100			20/11/2019...	Annulé par...			
A	1	1	NRBC#	0,00		10 <sup>6</sup> /L			20/11/2019...	Annulé par...			
			<b>Morpho...</b>										
O	2	2	NEUT (D...	40,0		%			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	NEUT (D...	22,58		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	EO%	2,0		%			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	EO#	1,13		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	BASO%	2,0		%			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	BASO#	1,13		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	LYMPH%	5,0		%			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	LYMPH#	2,82		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	MONO%	47,0		%			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	MONO#	26,53		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	BLAST%	0,0		%			20/11/2019...	Validé			
O	2	2	BLAST#	0,00		10 <sup>9</sup> /L			20/11/2019...	Validé			

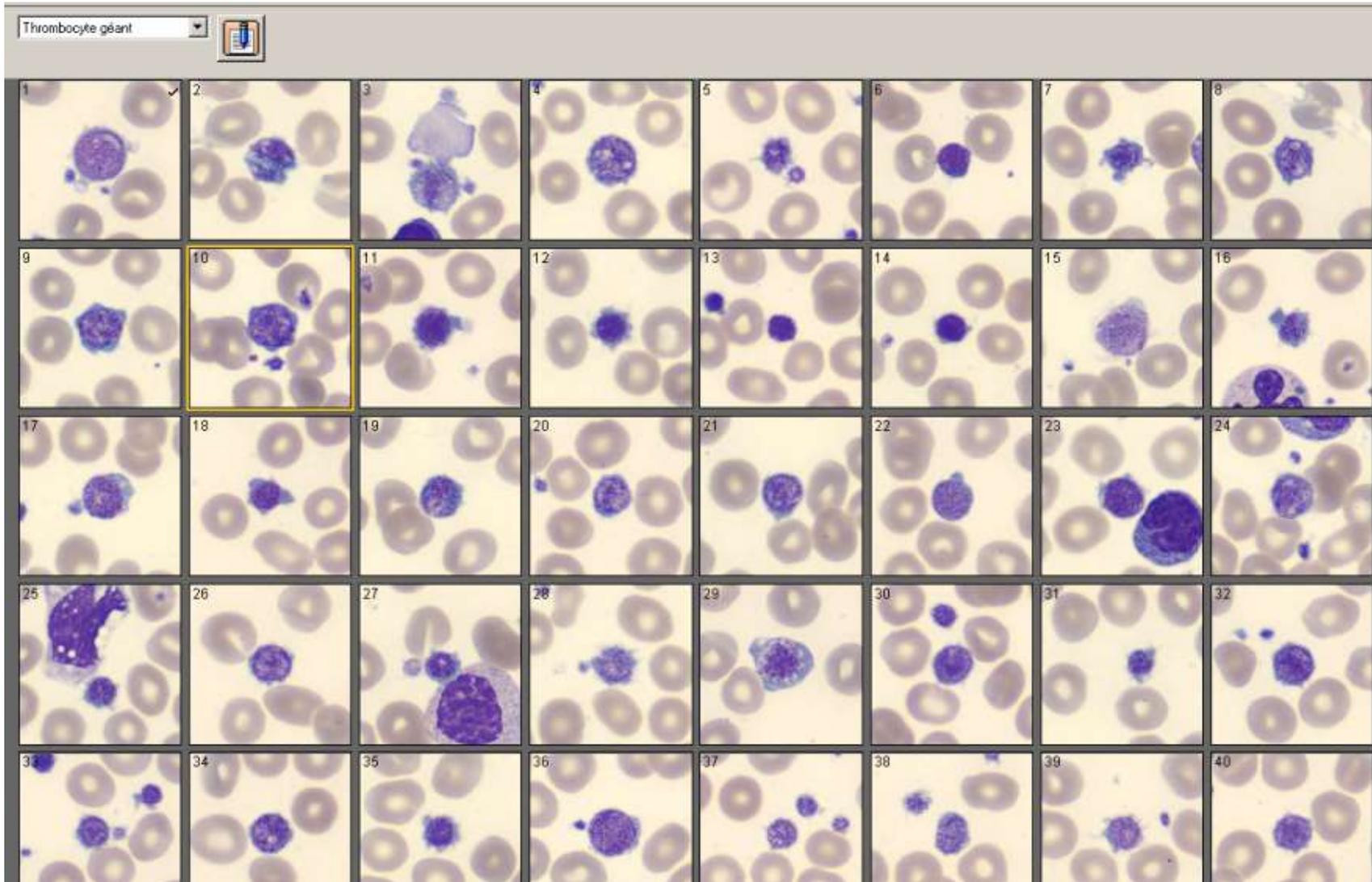


# LMMC: cytologie typique sur DM1200

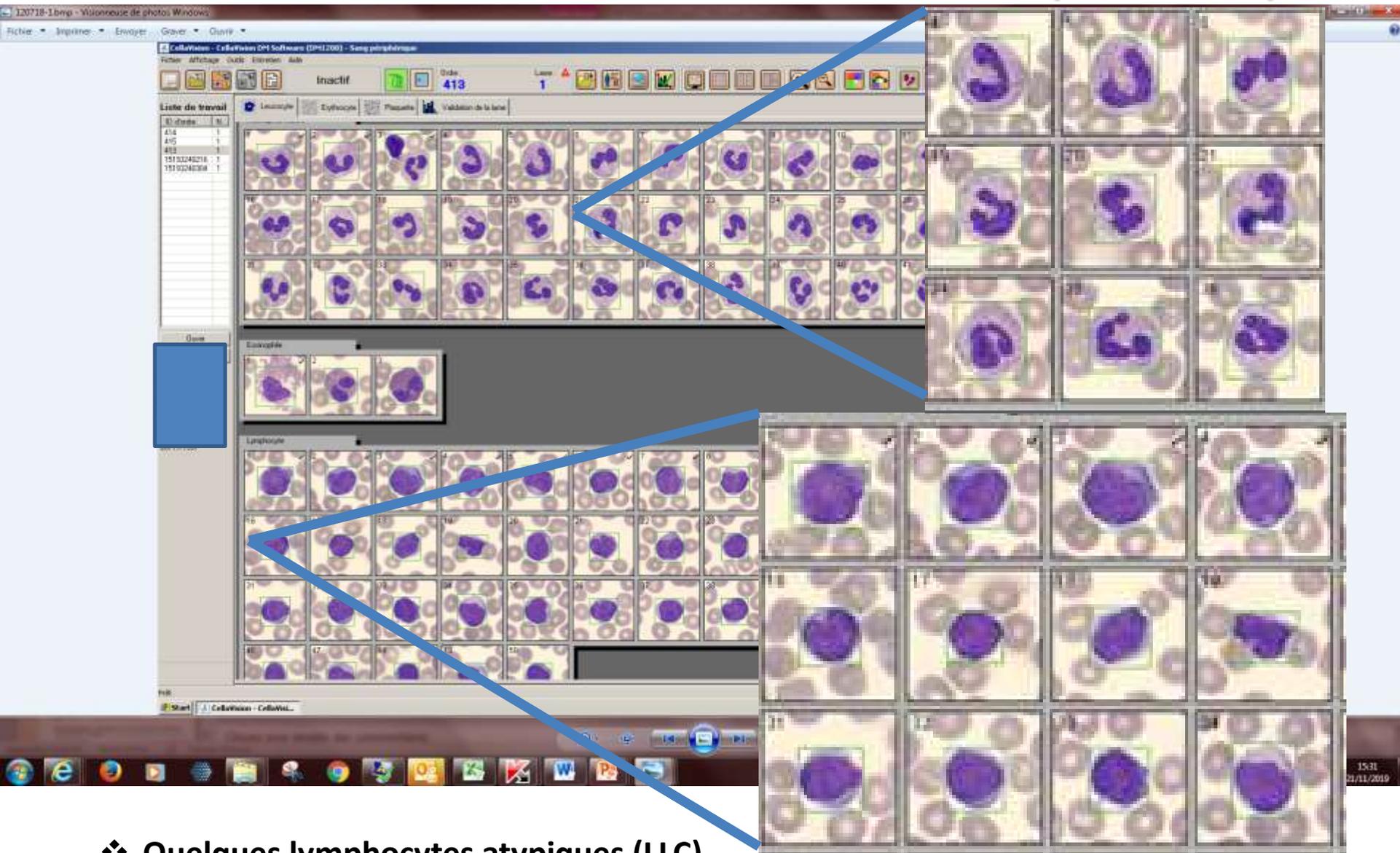


- ❖ PNN dégranulés+++
- ❖ Monocytes dystrophiques

# Macroplaquettes LMMC



# REVENONS à Mr B: revue de lame sur DM1200 (cellavision)



- ❖ Quelques lymphocytes atypiques (LLC)
- ❖ Absence de dysplasie granuleuse

# REVUE de LAME sur DM1200 (cellavision)

Inactif    Ordre : 413    Lame : 1

Leucocyte    Erythrocyte    Plaquette    Validation de la lame

49    50    51

**MONOCYTES d'aspect matures**

Monocyte

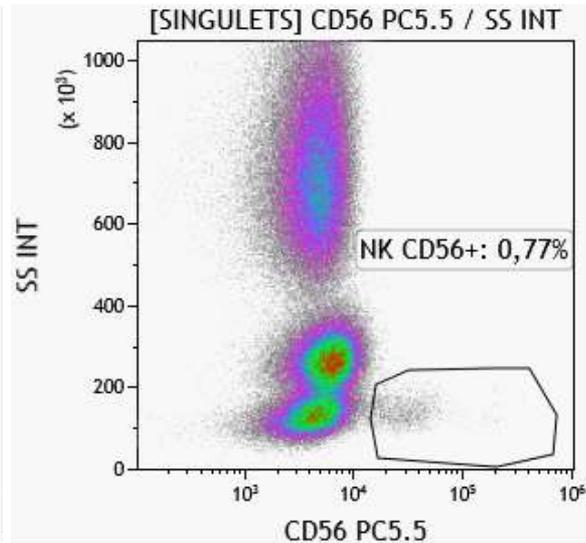
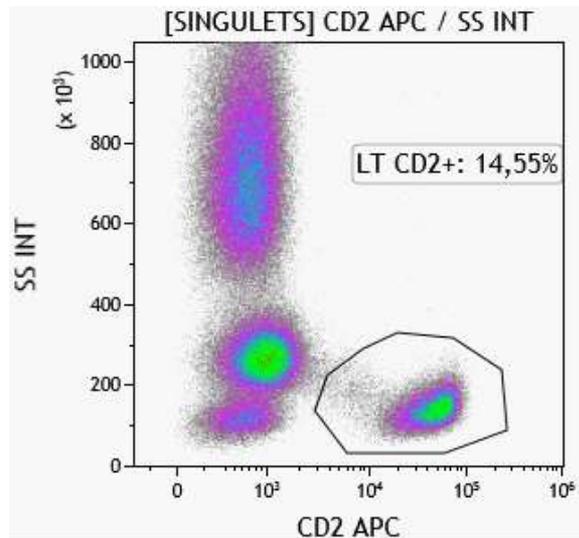
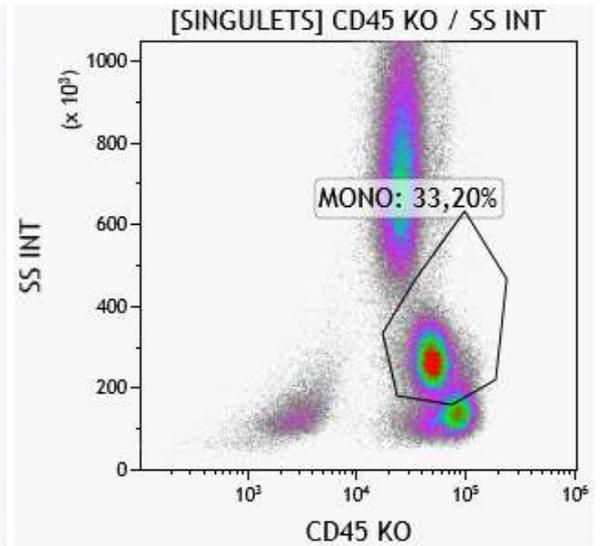
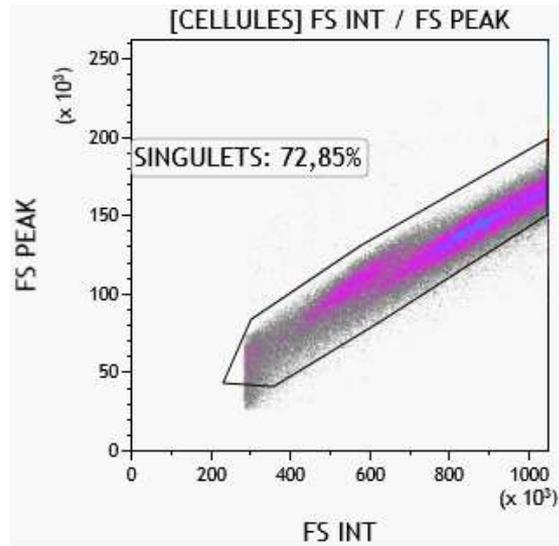
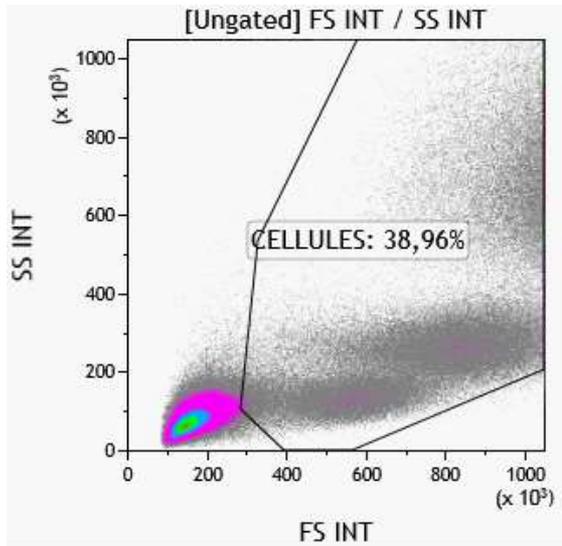
1    2    3    4    5    6    7    8

9    10    11    12    13    14    15    16

17    18    19    20    21    22

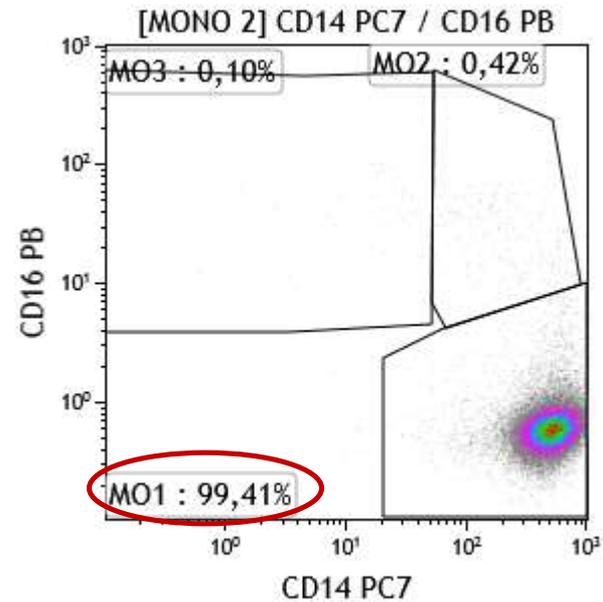
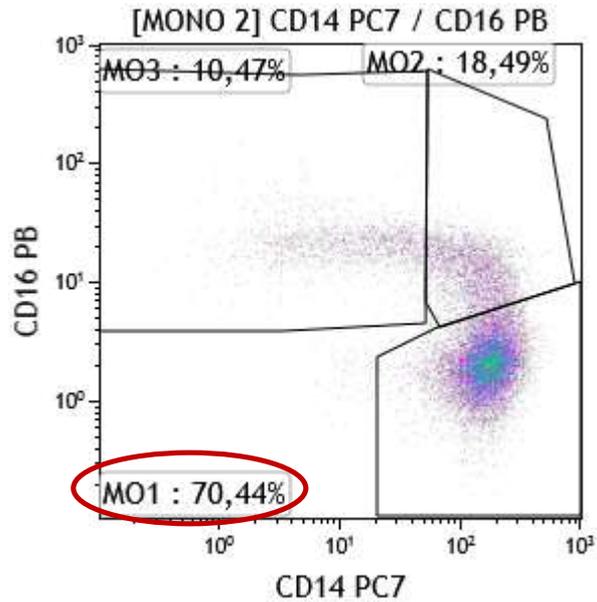
**Absence d'argument cytologique formel en faveur d'une LMMC, mais: monocytose chronique  
..... Immunophénotypage conseillé**

# IMMUNOPHENOTYPAGE MONOCYTAIRE- PRINCIPLE

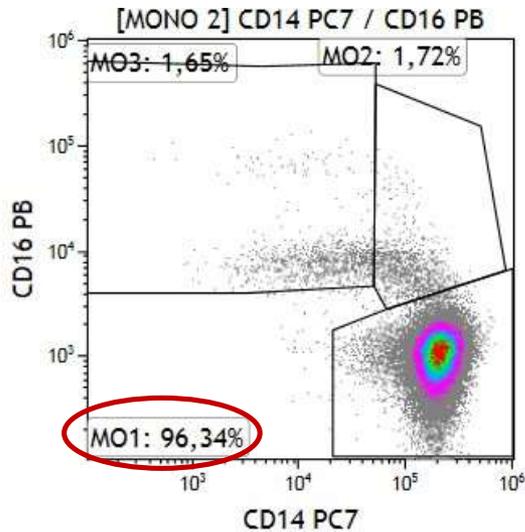
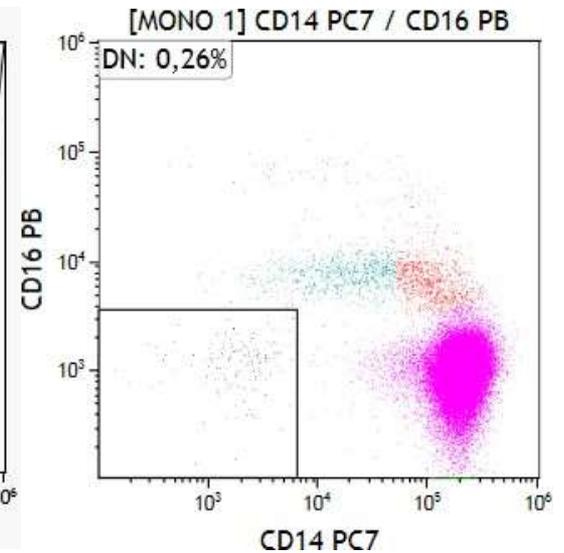
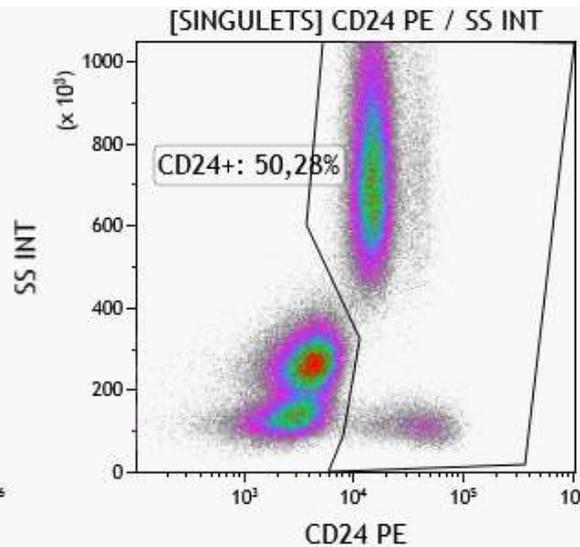
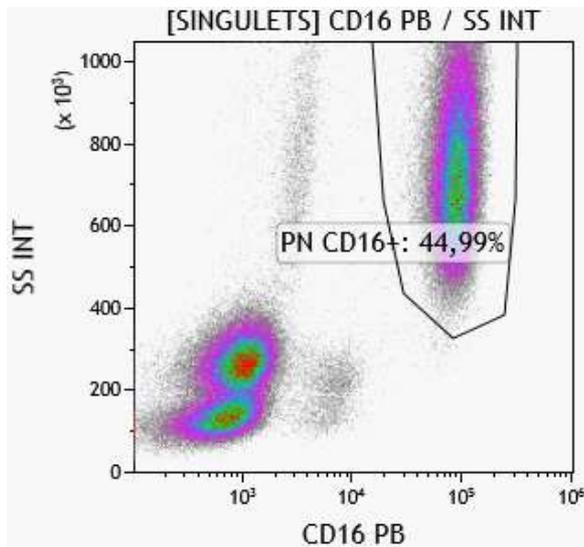


# IMMUNOPHENOTYPAGE MONOCYTAIRE

## Normal vs Pathologique



# IMMUNOPHENOTYPAGE MONOCYTAIRE- Mr B.



Excès de monocytes classiques CD14+/CD16-:  
évocateur de LMMC (> 94%)

Selimoglu-Buet, D. *et al.* Blood 2015  
(équipe IGR)

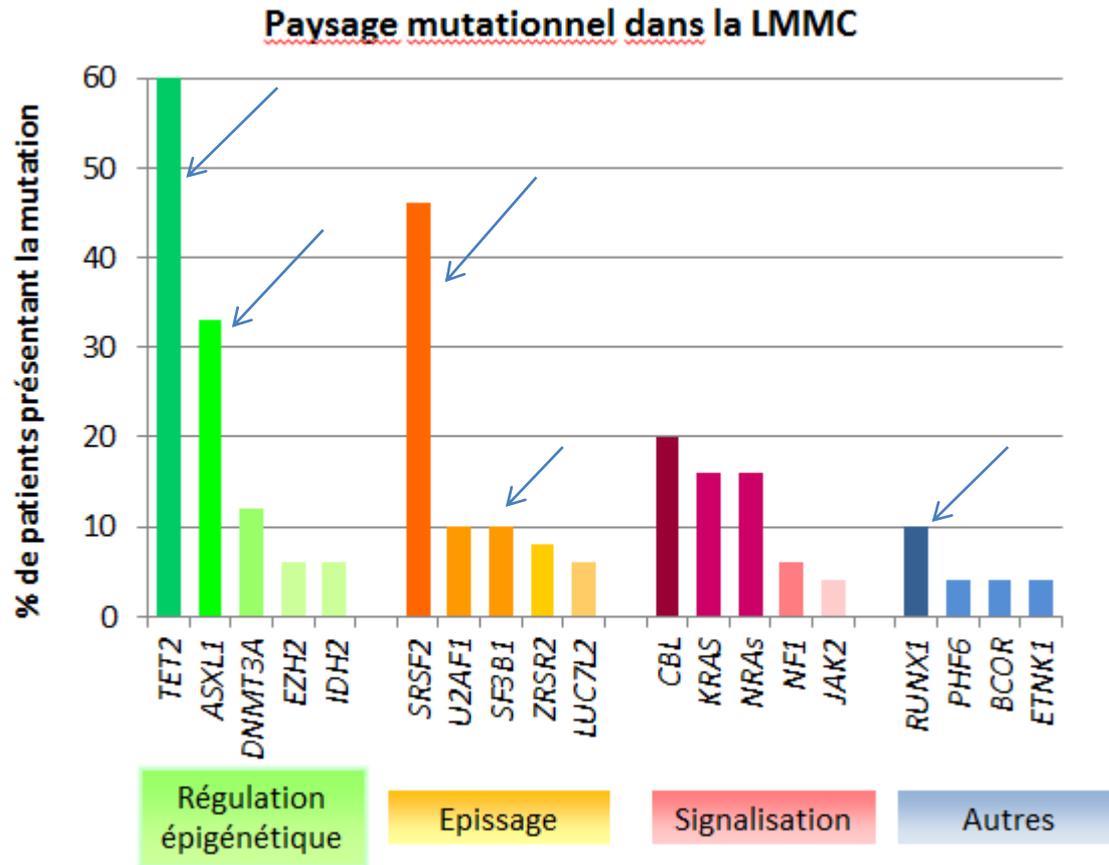
.....ETUDE CYTOGENETIQUE et MOLECULAIRE

- ❖ Conforter le diagnostic
- ❖ Eléments pronostiques
- ❖ Recherche de cible thérapeutique

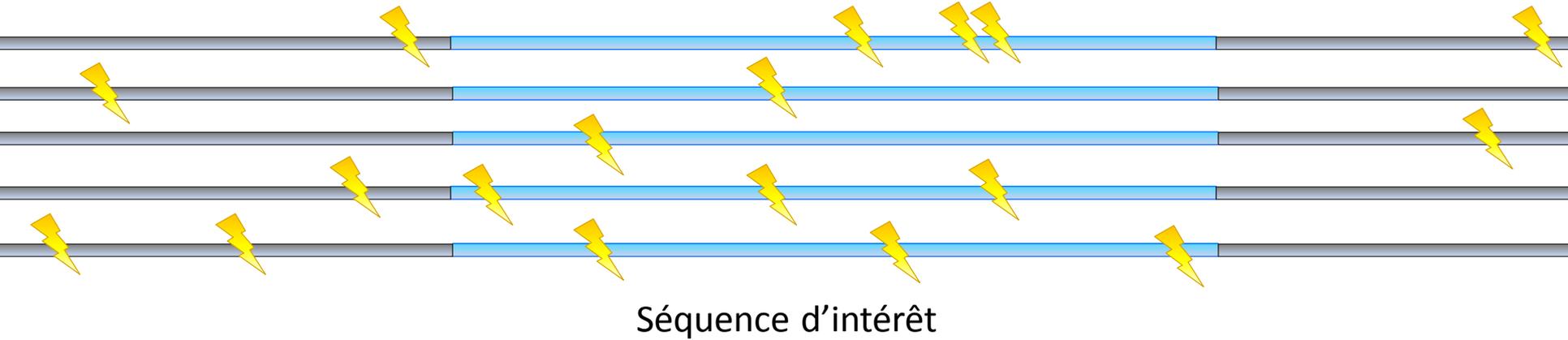
Gate Number	%Gated
All	61 287 100,00
MO1	59 041 96,34
MO2	1 052 1,72
MO3	1 013 1,65

# ETUDE DU PANEL MYELOIDE

## Séquençage NGS- « nouvelle génération »



# Méthode Haloplex



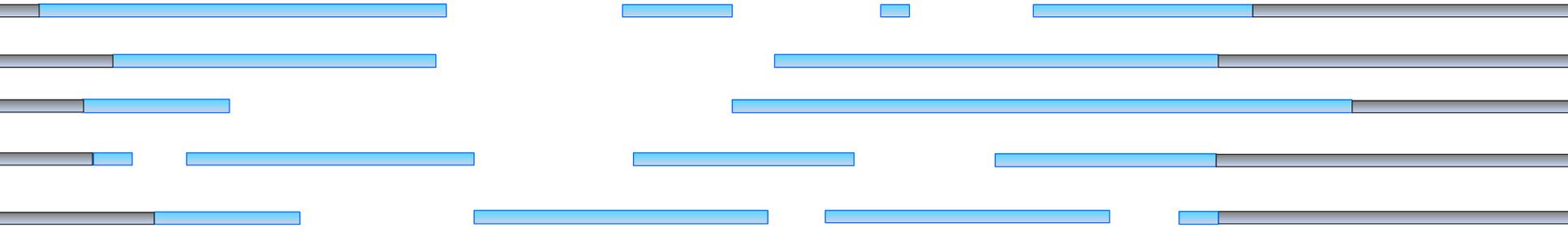
-Restriction enzymatique

# Méthode Haloplex



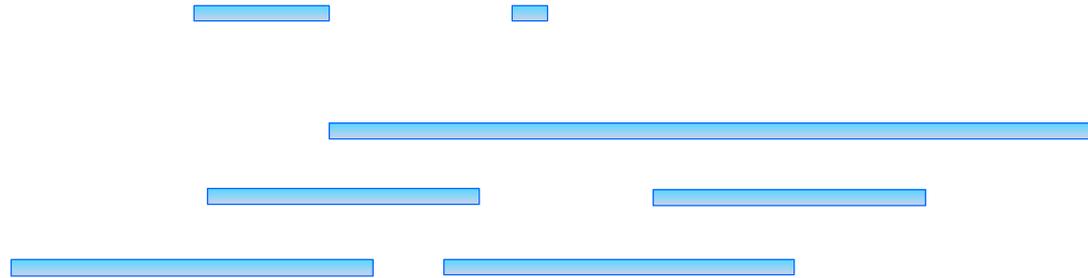
-Génère des Fragments de tailles variables +/- pertinents

# Méthode Haloplex



-Génère des Fragments de tailles variables +/- pertinents

# Méthode Haloplex



-Génère des Fragments de tailles variables +/- pertinents

# Méthode Haloplex



# Méthode Haloplex

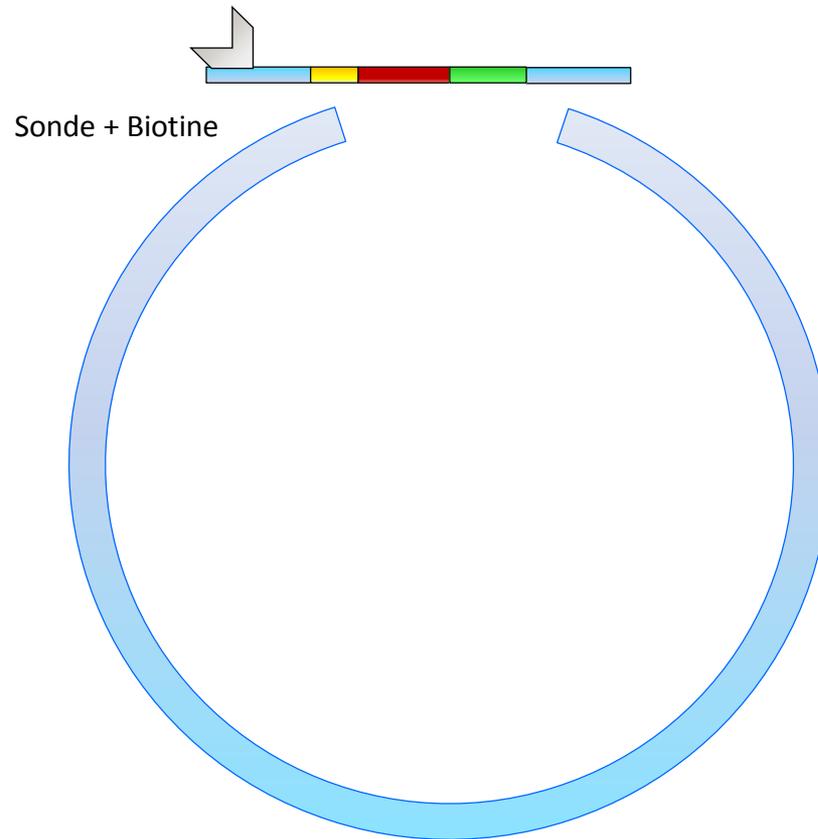


Sonde + Biotine



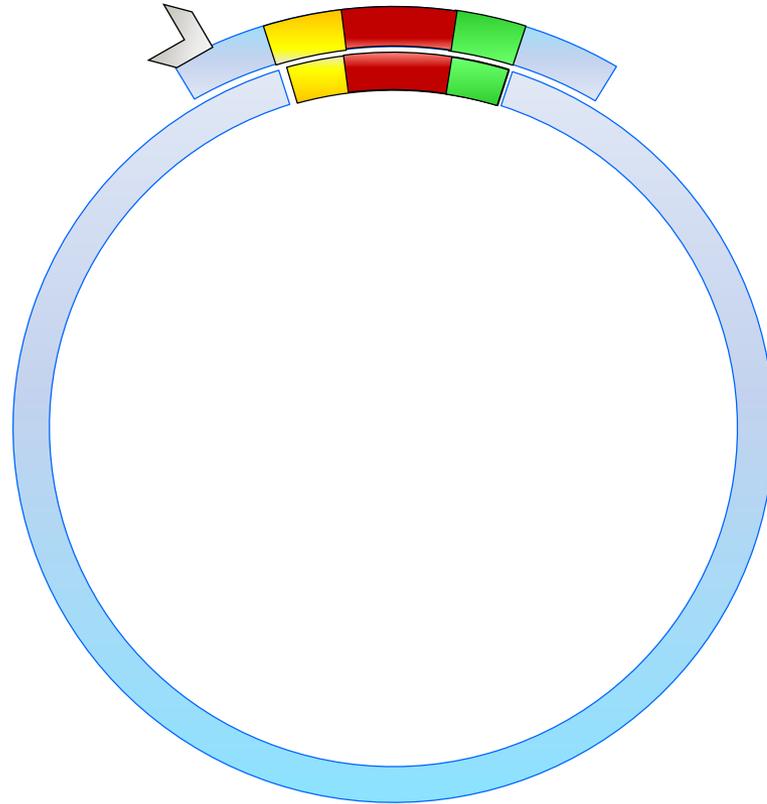
-Hybridation avec les sondes Haloplex = circularisation de l'ADN

# Méthode Haloplex



-Hybridation avec les sondes Haloplex = circularisation de l'ADN

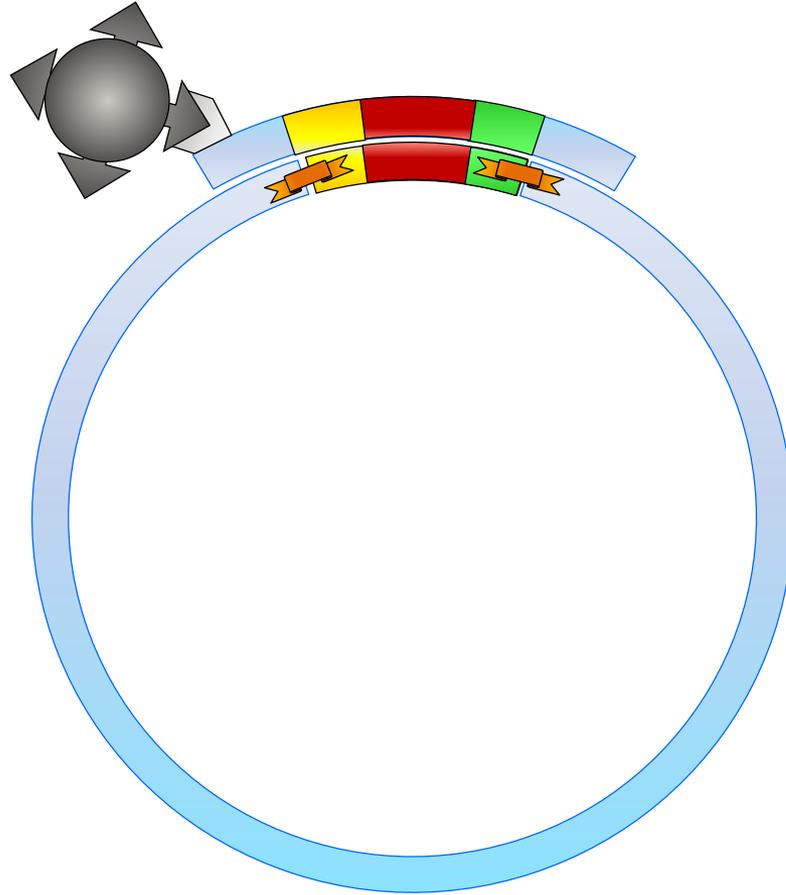
# Méthode Haloplex



-Hybridation avec les sondes Haloplex = circularisation de l'ADN

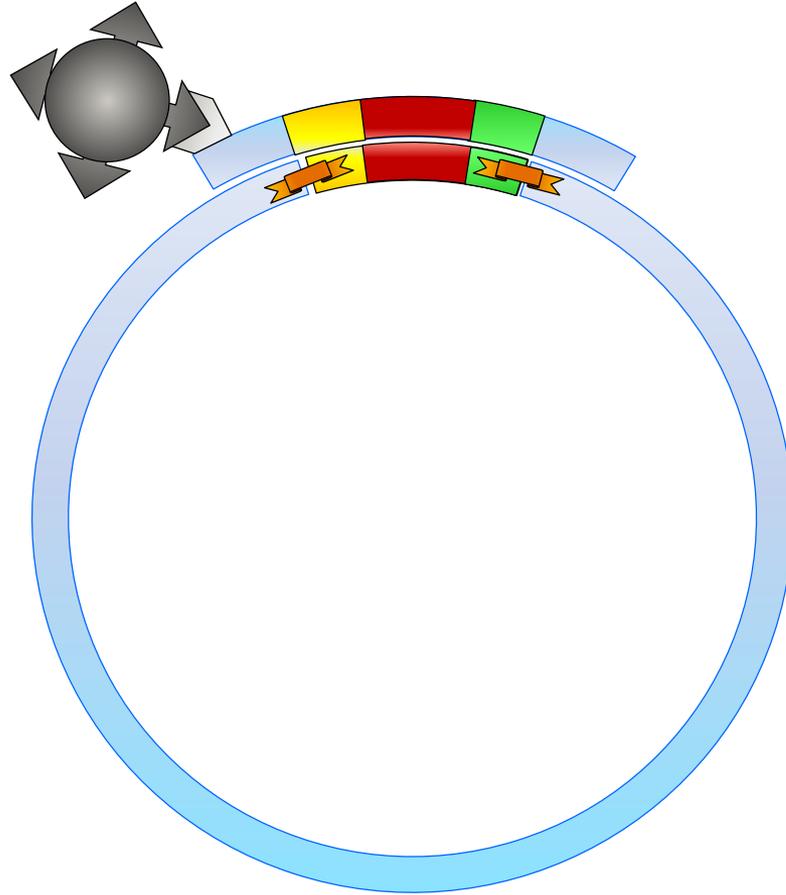
-index « étiquetage » de l'ADN du patient. »

# Méthode Haloplex



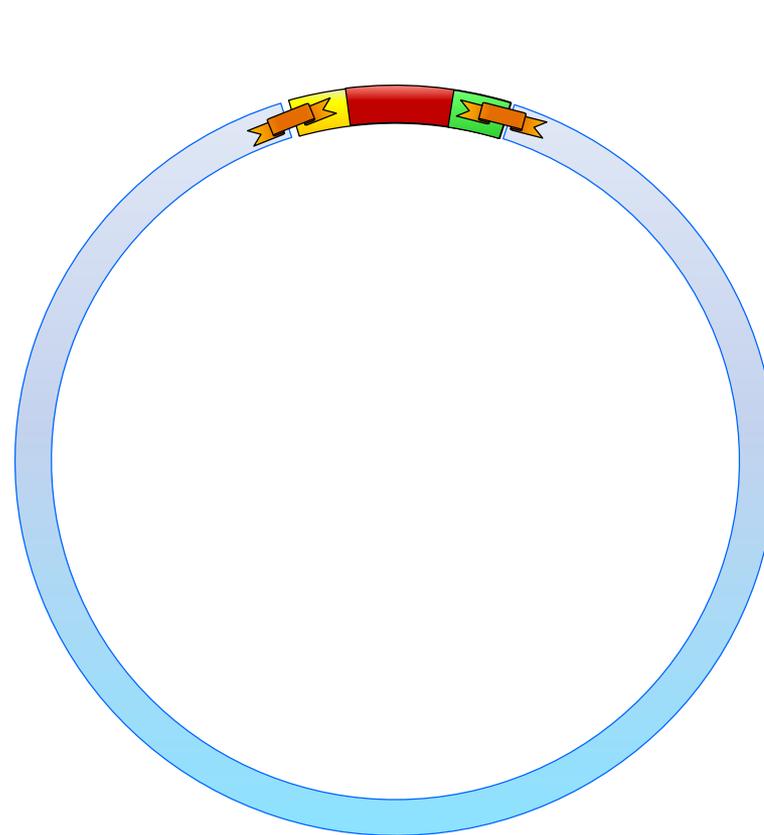
- Capture du complexe ADN patient - Index – Sonde biotinylée sur billes magnétiques de Streptavidine
- Ligation des index avec l'ADN d'intérêt

# Méthode Haloplex



-Dissociation du complexe sonde–biotine et de l'ADN circularisé

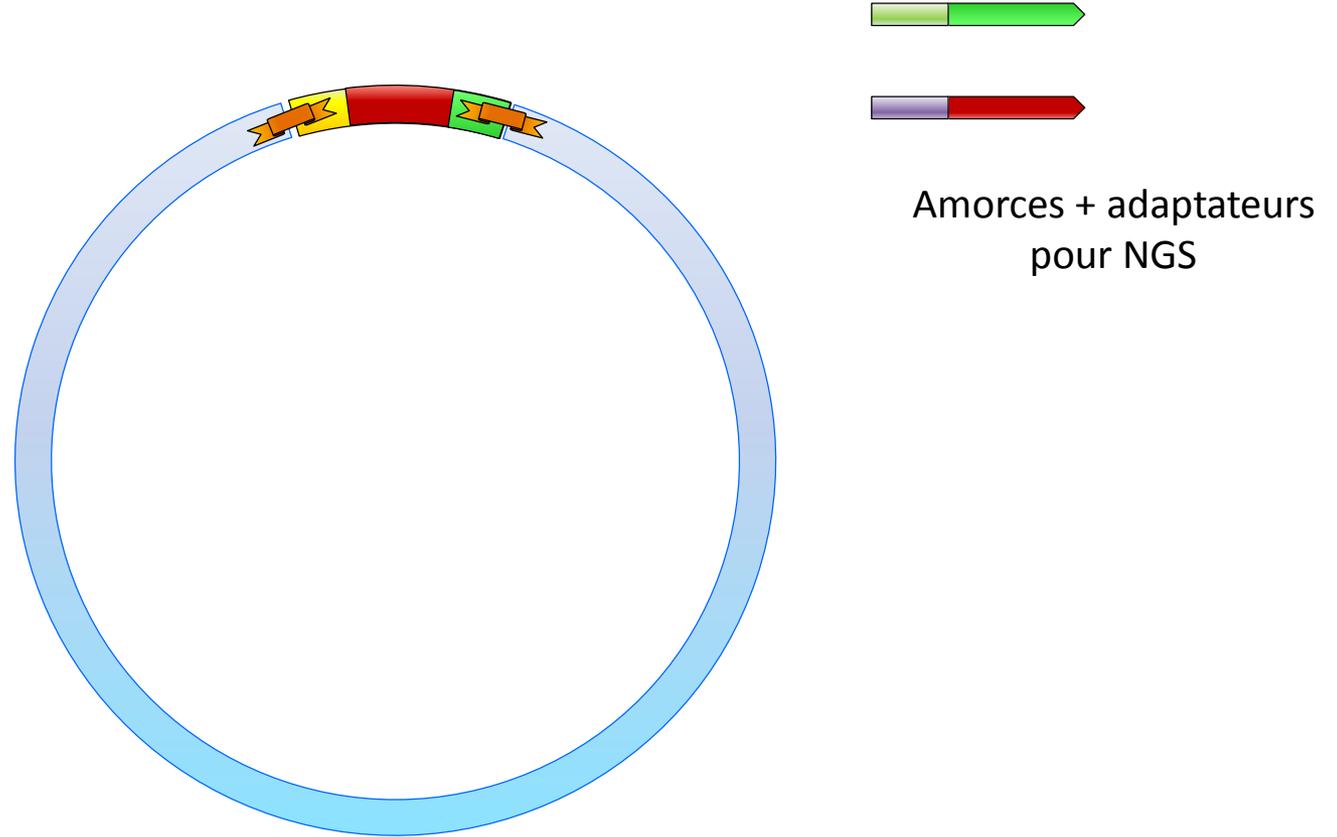
# Méthode Haloplex



Amorces + adaptateurs  
pour NGS

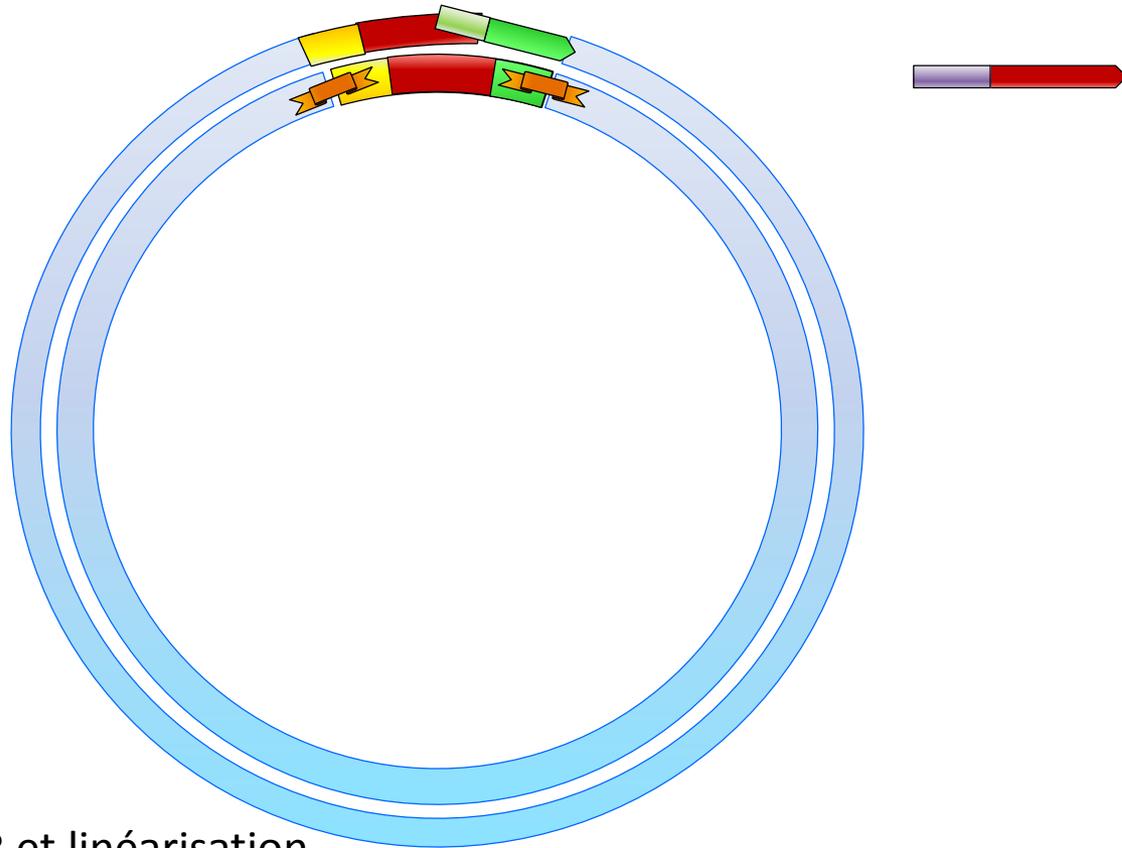
-Amplification par PCR

# Méthode Haloplex



-Amplification par PCR

# Méthode Haloplex



-Amplification par PCR et linéarisation  
de l'ADN amplifié

# Méthode Haloplex



-Préparation des Librairies

# Méthode Haloplex



-Préparation des Librairies

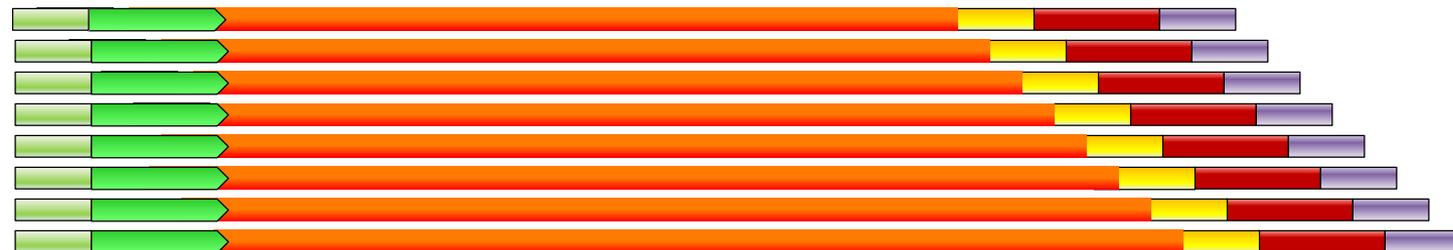
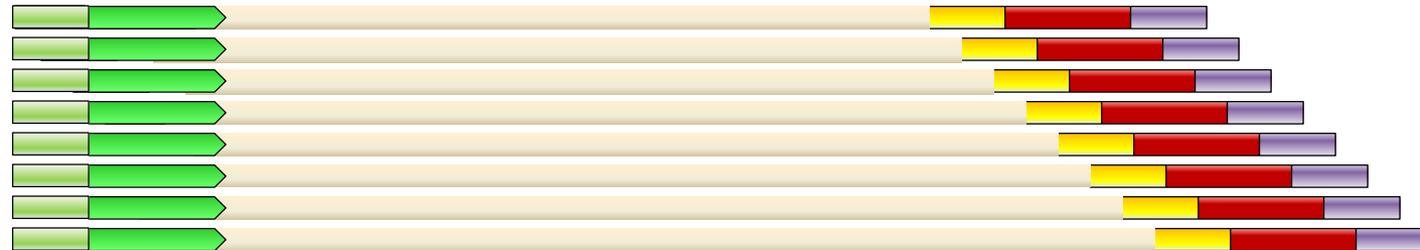
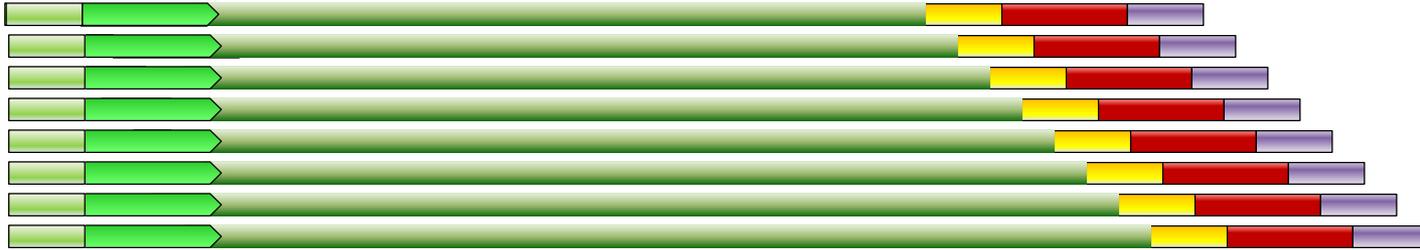
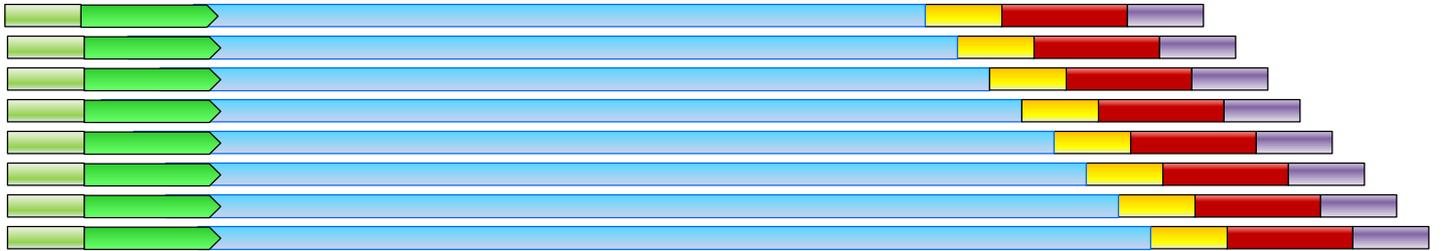
# Méthode Haloplex

Gène 1

Gène 2

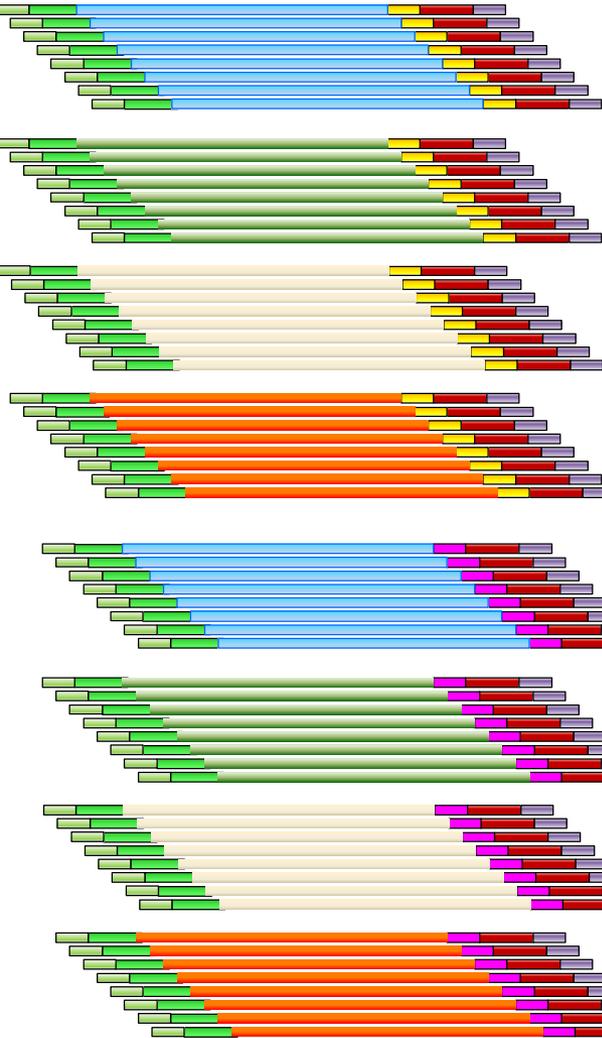
Gène 3...

...Gène 75

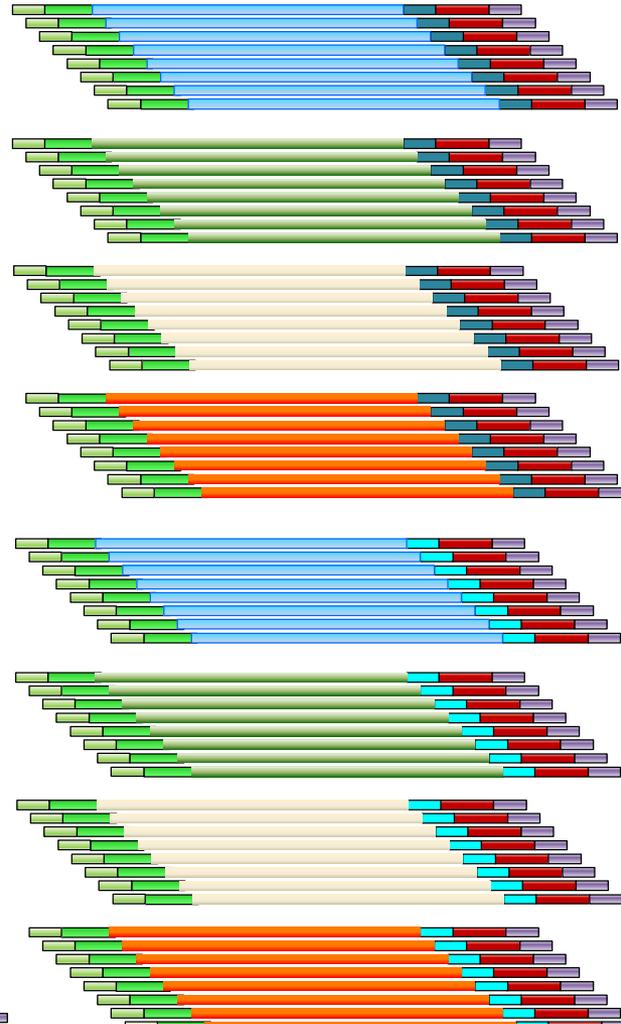


# Méthode Haloplex

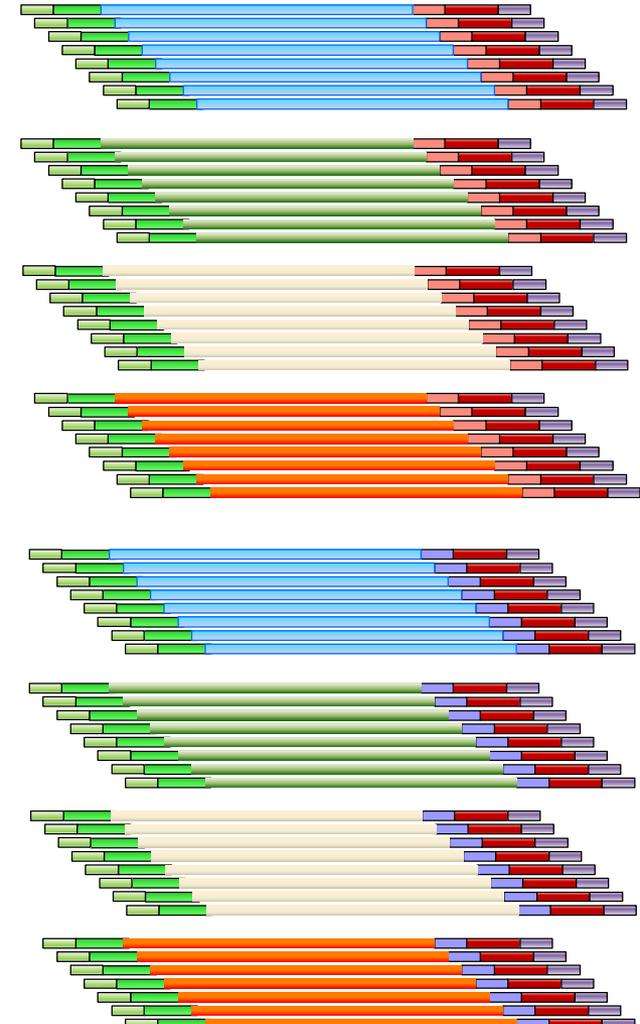
Patient 1



Patient 2



Patient 3



Patient 4

Patient 5...

...Patient 48

# Principe de séquençage sur Illumina Miseq



**Intro to Sequencing by Synthesis- Industry-leading Data Quality-FLUVORE.mp4**

<https://www.youtube.com/watch?v=HMyCqWhwB8E>

# WORKFLOW

## Séquençage nouvelle génération (NGS)

(exemple: Librairie type Haloplex )

- ❖ **Librairie 36h**
- ❖ **Séquençage 24h**
- ❖ **Analyse: 1h /dossier**
- ❖ **Coût optimisé: 300€/patient**
- ❖ **Amortissement équipements lourds..**
- ❖ **Temps technique, médical**

# Analyse bioinformatique en 3 clics - SDDM® (après 2 mois de travail avec le bioinformaticien)

P...	T...	Gene	Coding...	c.DNA	Depth	VF%	Genome...	Protein	Chr...	Exon ID	dbSNP	G1000	Cosmic Coding
5	INDEL	RUNX1	frameshift	c.211delC	832	37.3	6259198	p.Leu/1Serfs*24	21	1			COSM24719
4	SNP	TET2	nonsense	c.2759T>A	774	29.2	06157858	p.Leu920*	4	3			
5	SNP	SF3B1	missense	c.2225G>A	425	2.3	98266611	p.Gly742Asp	2	16	rs755415626		COSM145923
5	SNP	SRSF2	missense	c.284C>T	354	18.9	4732959	p.Pro95Leu	17	1	rs751713049		COSM146288
4	SNP	ATM	missense	c.8731A>G	742	2.6	08224552	p.Thr2911Ala	11	60	rs786203271		
4	SNP	ATM	missense	c.5227A>C	1083	3.5	08172424	p.Thr1743Pro	11	35	rs751713049		
5	INDEL	ASXL1	frameshift	c.1934dupG	589	38.7	1022441	p.Gly646Trpfs*12	20	12	rs756958159		COSM34210
	SNP		intergenic		257	40.9	96771130		14		rs3742474	0.2374	
	SNP		intergenic		589	46.0	96765001		14		rs12435016	0.2522	
	SNP		intergenic		761	100.0	96775610		14		rs3742474	0.2374	
	SNP		intergenic		32	48.4	967774		14		rs12435016	0.2522	
3	SNP		intergenic		106	55.7	96766880		14		rs1280497	0.7678	
3	SNP		intergenic		621	51.4	96760563		14		rs7158298	0.2524	
3	SNP		intergenic		400	47.5	96770000		14		rs3742474	0.2374	
3	SNP	KMT2A	intronic	c.4333-1261T>A	532	50.8	118358068		11	11	rs525549	0.237	
3	SNP	KMT2A	intronic	c.4333-1261T>A	532	50.8	118358068		11	11	rs525549	0.237	
2	INDEL	RUNX1	intronic	c.98-1248_98-...	656	45.3	36260629		21	4	rs559174625	8.0E-4	
2	SNP	SETBP1	missense	c.4129G>C	1402	46.2	42618578	p.Val1377Leu	18	5	rs77518617	0.0048	
1	SNP		intergenic		373	49.9	101211157		14		rs927257	0.5431	
1	SNP		intergenic		155	100.0	33794490		19		rs34508287	0.1306	
1	INDEL		intergenic		983	96.4	36809566		21		rs397798786	1.0	
1	SNP		intergenic		942	48.0	36808260		21		rs2049811	0.2999	
1	SNP		intergenic		614	52.1	101303361		14		rs8019930	0.2564	

.....DÉJÀ ETIQUETES « patho »...

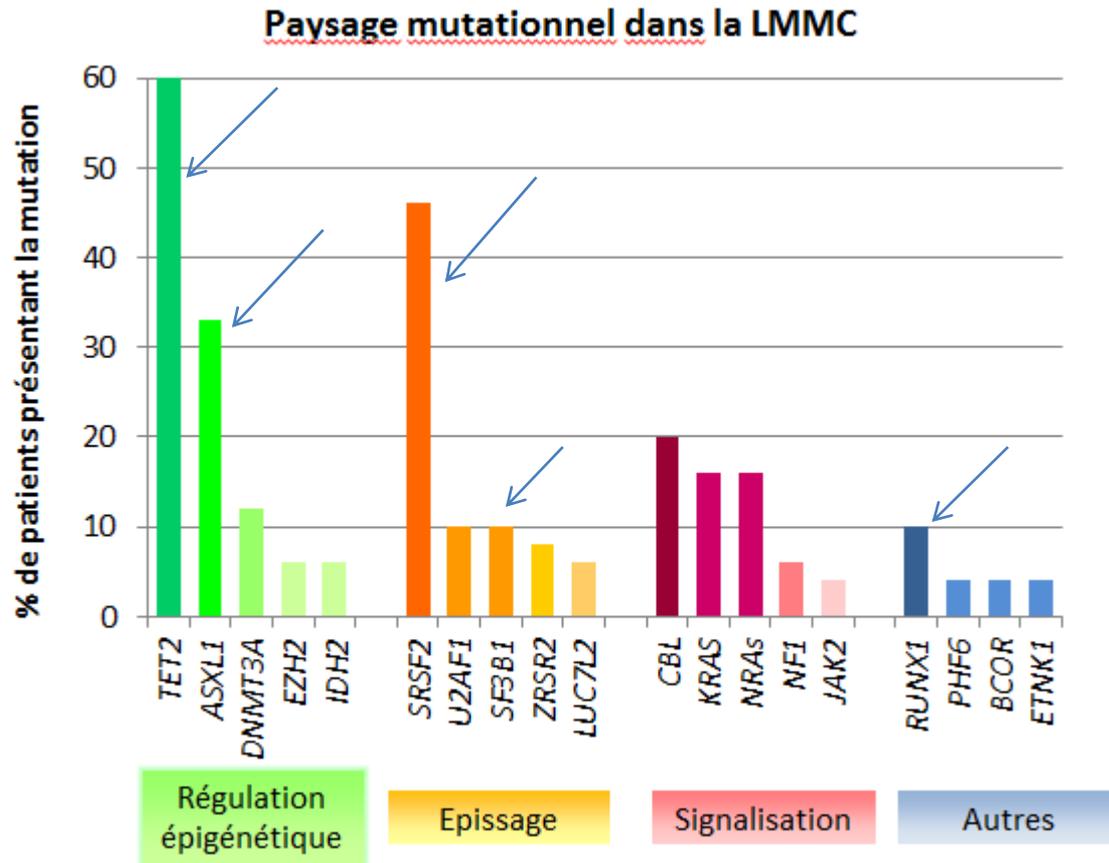
DES INTRUS...

.....DÉJÀ FICHES « COSMIC »

**4 gènes classiques de LMMC avec % de mutation élevé**  
**3 gènes avec % de mutation faible.... LLC? Artéfacts? sous-clone LMMC?**

# ETUDE DU PANEL MYELOIDE

## Séquençage NGS- « nouvelle génération »



# VALIDATION BIOLOGIQUE

## vraiment utile?

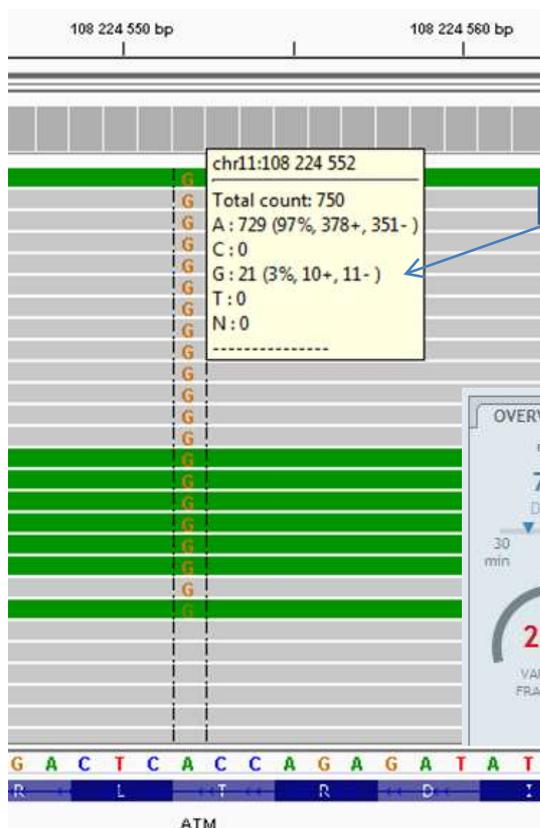
Interprétation des 2 mutations du gène ATM, (souvent anormal dans la LLC)

P...	T...	Gene ▲	Coding...	c.DNA	Depth	VF%	Genome...	Protein	Chr...	Exon ID	dbSNP	G1000	Cosmic Coding
4	SNP	ATM	missense	c.8731A>G	742	2.6	08224552	p.Thr2911Ala	11	60	rs786203271		
4	SNP	ATM	missense	c.5227A>C	1083	3.5	08172424	p.Thr1743Pro	11	35	rs758924620		
1	SNP	ATM	5'UTR	c.-4519G>A	57	52.6	08093833		11	2	rs189037	0.476	
1	SNP	ATM	3'UTR	c.*1604C>T	48	41.7	08237839		11	63	rs227091	0.5182	
1	SNP	ATM	5'UTR	c.-2211A>G	463	44.7	08096141		11	2	rs228590	0.5194	
1	SNP	ATM	5'UTR	c.-1019A>G	639	49.0	08097333		11	2	rs228591	0.5377	
1	SNP	ATM	5'UTR	c.-3132A>G	78	51.3	08095220		11	2	rs625120	0.5192	

➤ Perte d'un allèle non vue en cytogénétique?

❖ Non : variants ATM hétérozygotes 50% attestant de la présence des 2 allèles

➤ Sous-clone au sein de la LMMC? mutations de la LLC? Artefact?



- Séquence « propre »
- 10 lectures « reads » sens et antisens mutés
- Pas d'autre échantillon connu avec ce variant
- Pathogénicité *in silico* vraisemblable

❖ **Artefact très improbable**



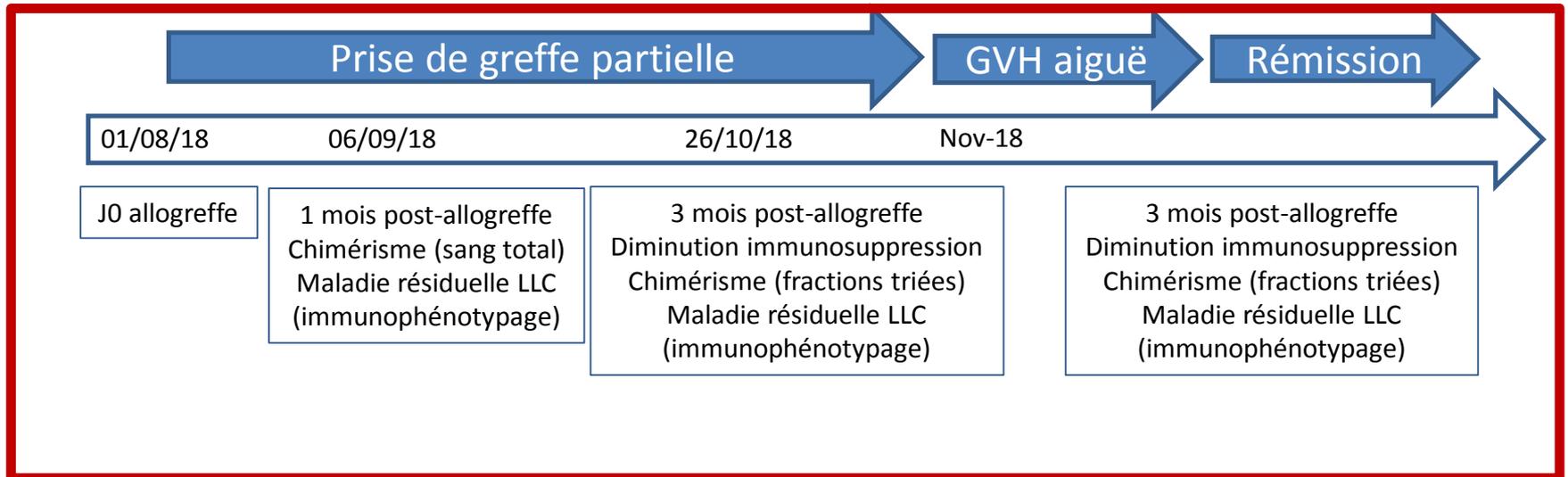
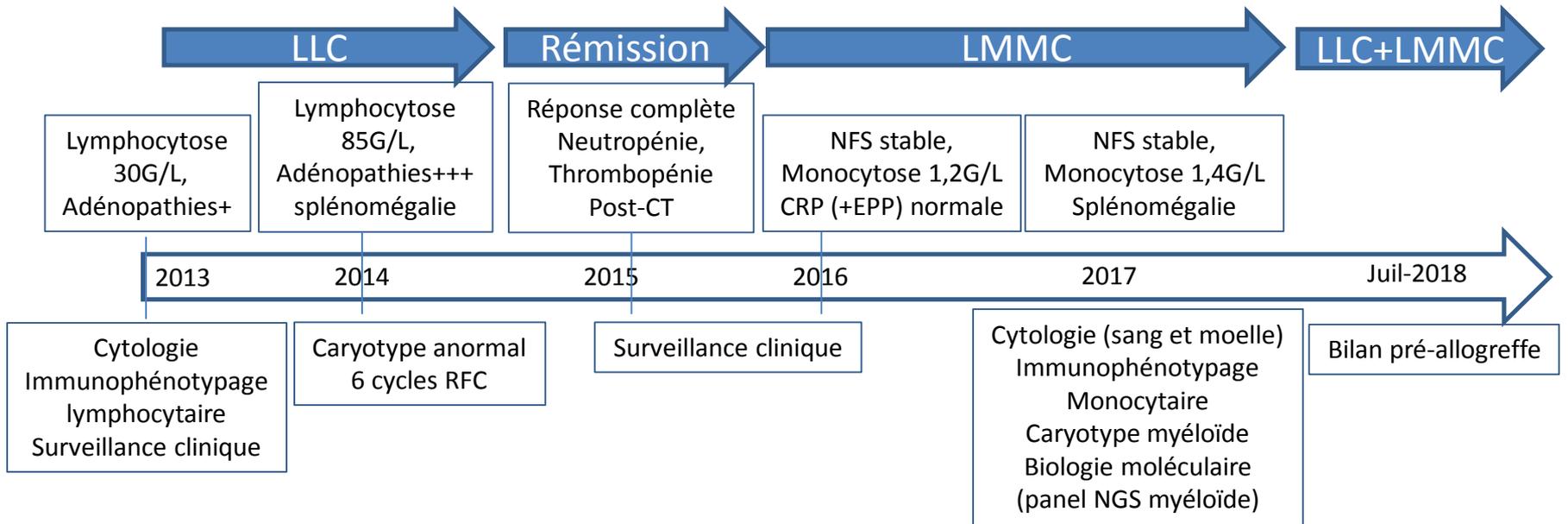
- **NFS et phénotypage** : 6% lymphocytes B de LLC
  - 3% des allèles ATM = 6% des cellules sont mutées
- ❖ **Concordance % lympho et % mutation(VAF)**

❖ Forte probabilité de LLC avec mutations ATM, à confirmer si nécessaire par séquençage des lymphocytes B CD19+ triés après contrôle de la pureté du tri en CMF.

➡ **La cytologie, la cytométrie sont indispensables à la compréhension des résultats**

# SCENARIO- la suite

## Double hémopathie = ALLOGREFFE de CSH!

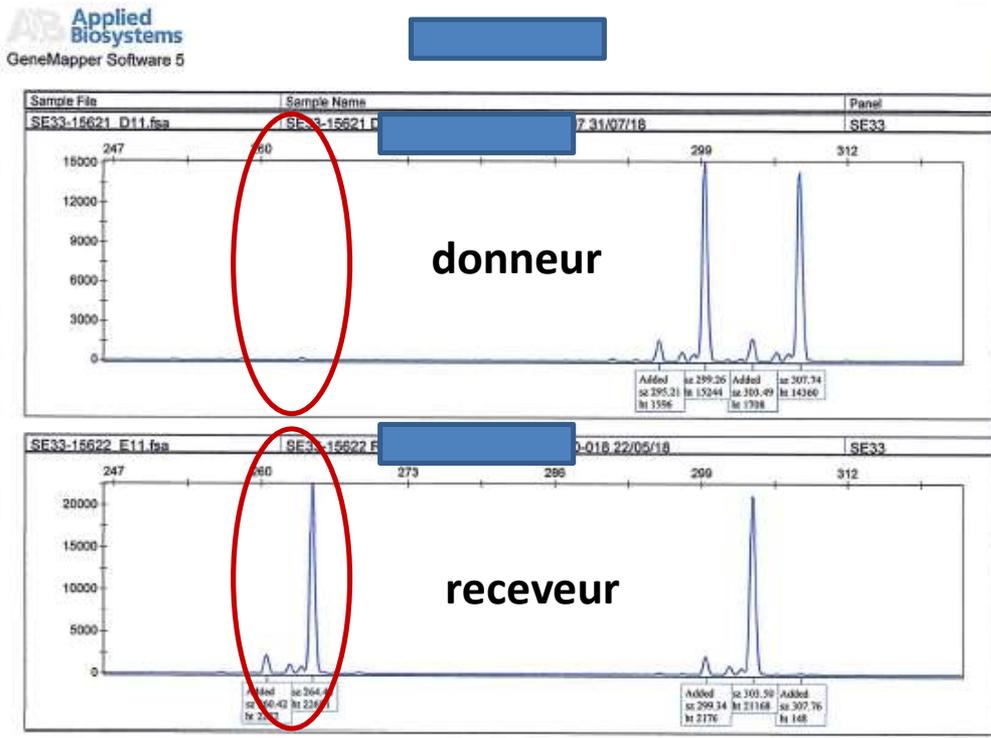


# Etude de la prise de greffe (Chimérisme)

## ❖ PRINCIPE

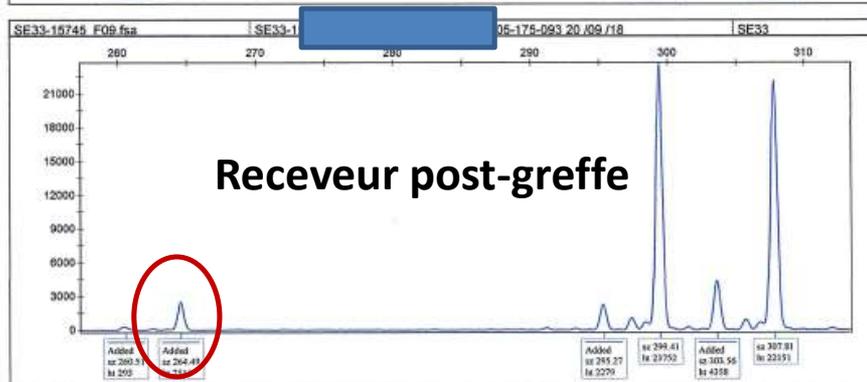
Amplification par PCR fluorescente de région répétées du génome (Short Tandem Repeat-STR)  
En espérant que le nombre de répétitions= taille du fragment sera différente donneur/receveur

## AVANT GREFFE



- ❖ Etude de 10 marqueurs avant greffe
- ❖ Choix du plus discriminant (ici « SE33 »)
- ❖ Empreinte génétique..

# Etude de la prise de greffe (Chimérisme à J30 sur sang total)



❖ Analyse brute: reste 5% de receveur

❖ Phéno LLC: 5% de lymphocytes

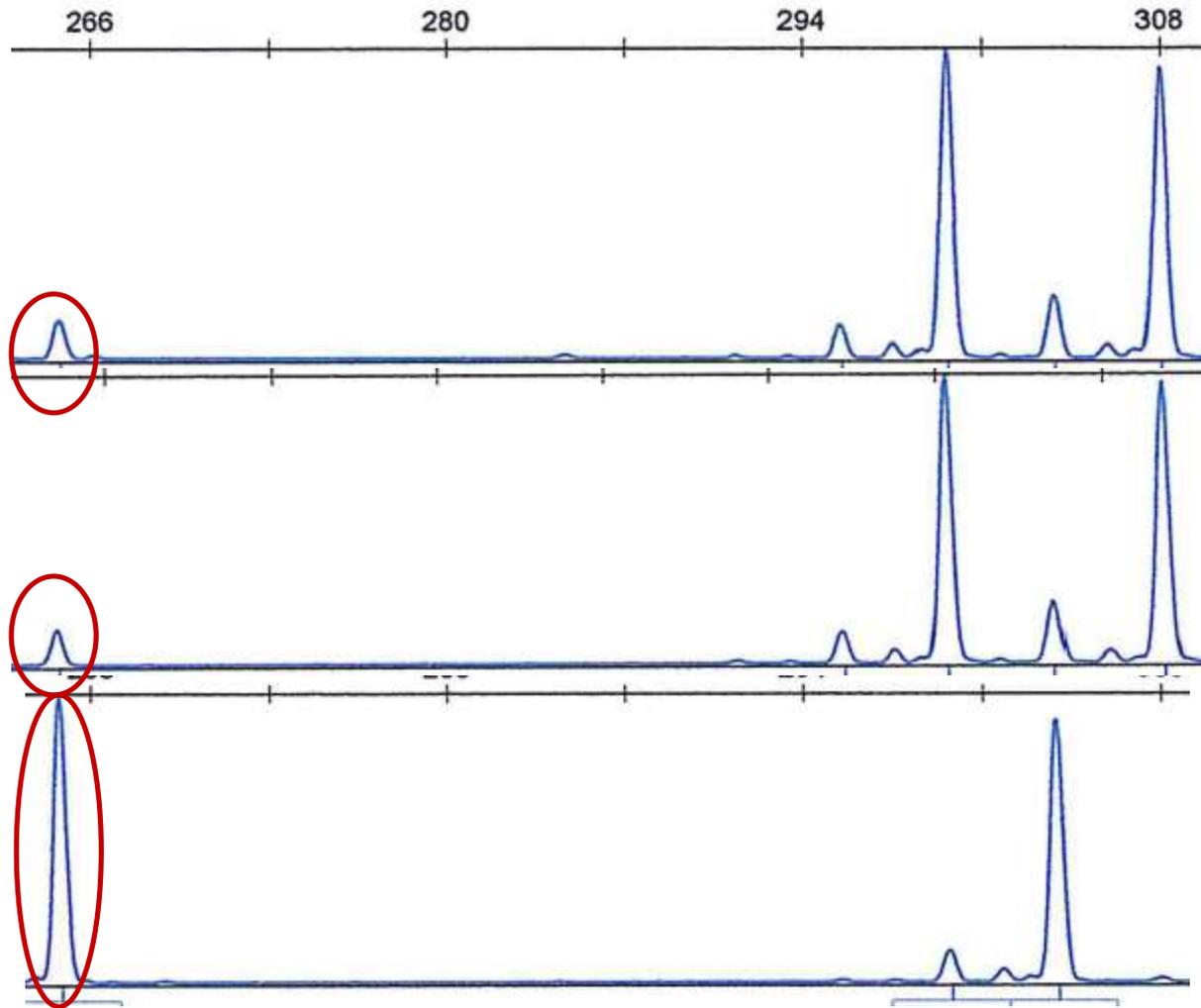
❖ Hypothèse: prise de greffe à 100%  
mais persistance 5% de cellules de LLC



Comment le démontrer?  
Pourquoi le démontrer?

# Comment affiner l'analyse du chimérisme?

## J60 : étude des fractions triées CD19+ et CD19nég



CD19 nég: PNN + Mono + LyT  
95% donneur

CD3+ : Ly T  
95% donneur

CD19 pos: Ly B=LLC  
100% receveur

➔ Chimérisme sub-total T-Myéloïde: bonne prise de greffe, MAIS il reste de la LLC

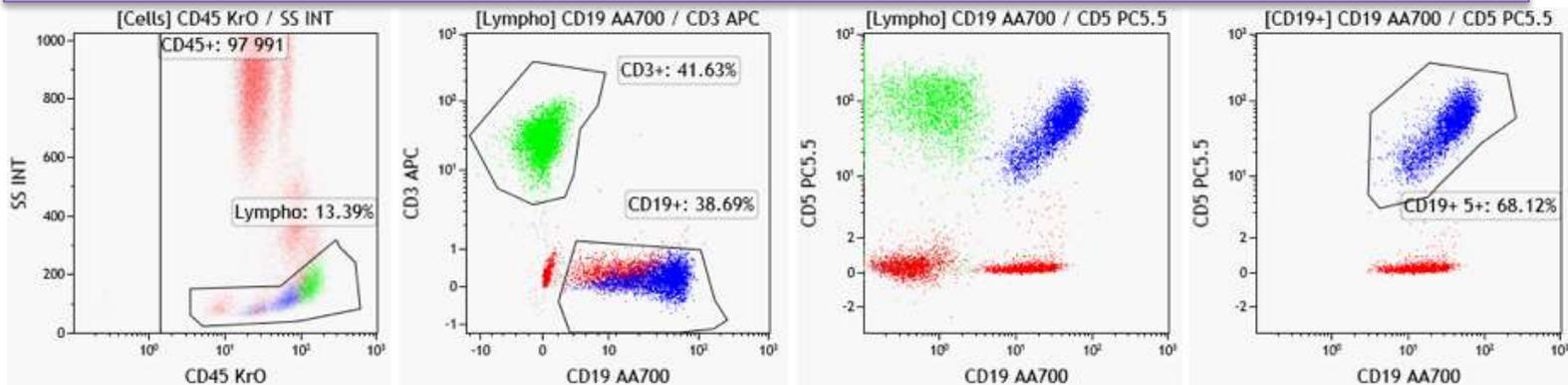
## Pourquoi avoir affiné l'analyse du chimérisme dans ce cas?

- ❖ **Vérifier la prise de greffe pour autoriser la baisse de l'immunosuppression**
  - ❖ **dans le but d'augmenter l'effet « GVL » (greffon contre leucémie)**
  - ❖ **Sans risquer le rejet du greffon**
  - ❖ **Mais au risque d'une « GVH » (greffon contre l'hôte)**

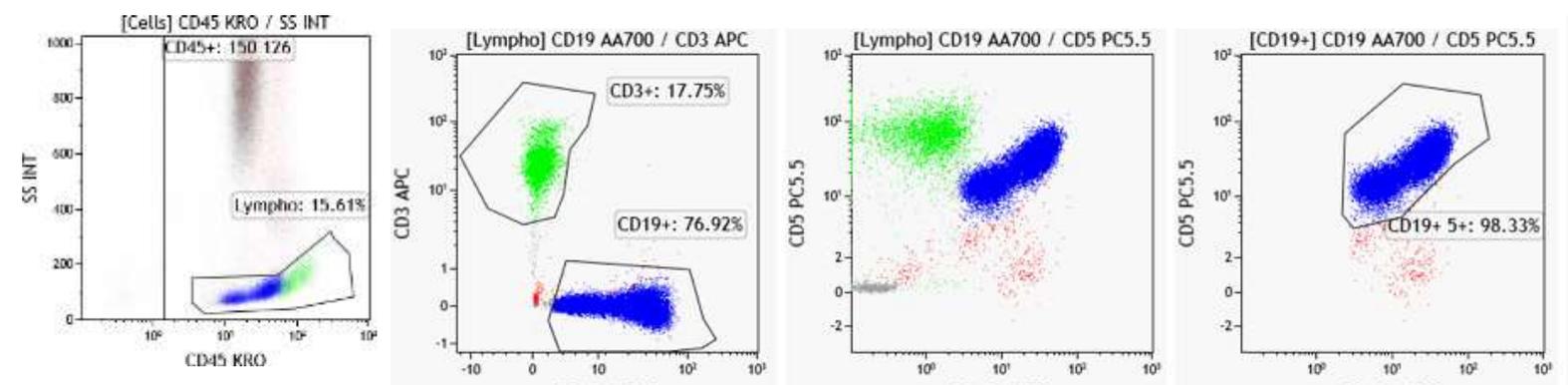
... et en effet....

# **Etude de la maladie résiduelle phénotypique post-allogreffe**

MO 04/09/2018 clone lymphoïde B CD19+/CD5+: 3.5% des cellules médullaires

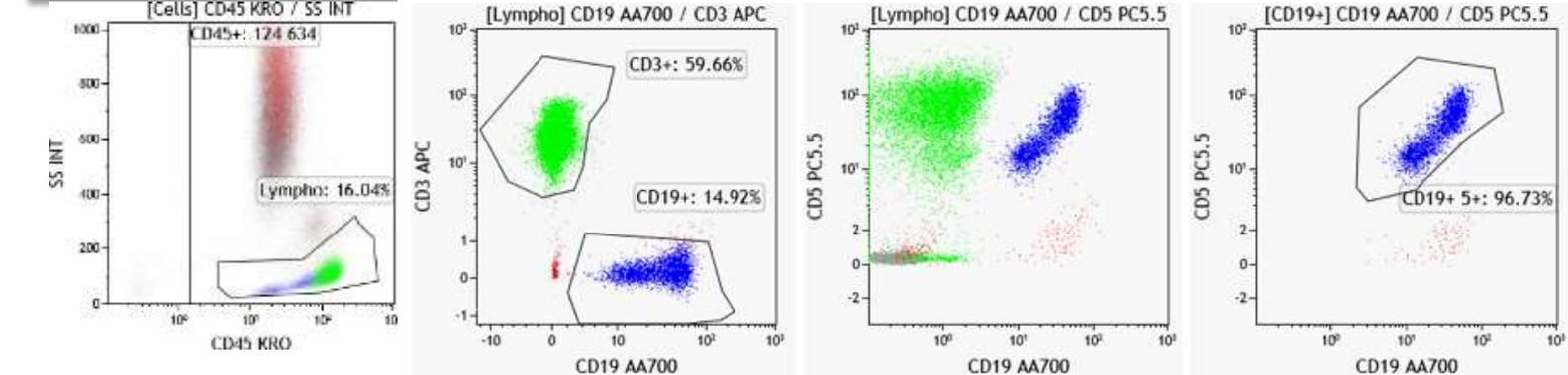


MO 04/10/2018 clone lymphoïde B CD19+/CD5+ 2 mois post allogreffe : 11.8% des cellules médullaires



❖ Immuno-suppression  
 ❖ GVH aiguë++

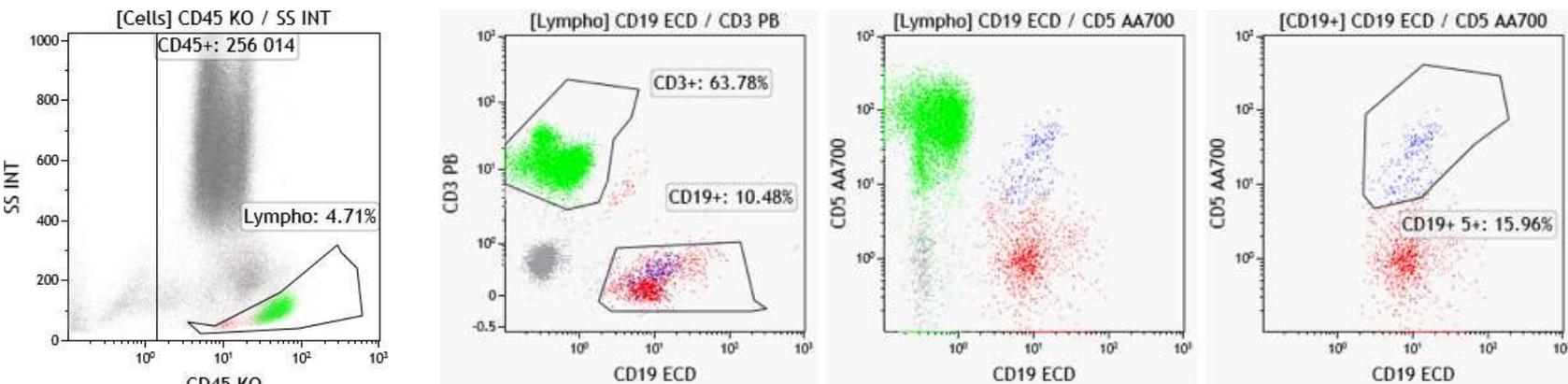
MO 03/01/2019 clone lymphoïde B CD19+/CD5+ 5 mois post allogreffe: 2.3% des cellules médullaires



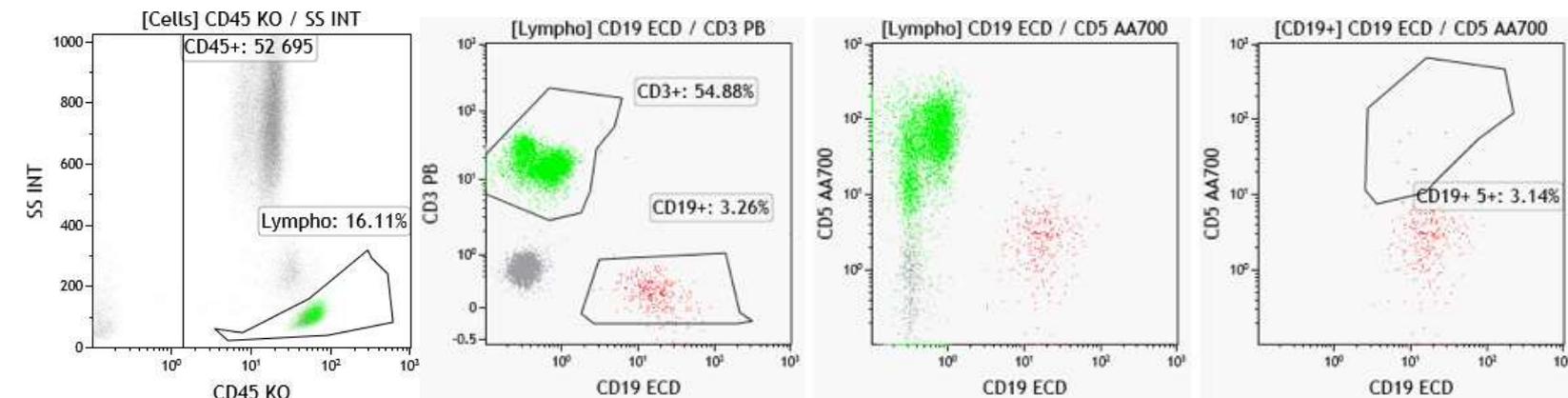
❖ GVL??

Evolution de la Maladie résiduelle phénotypique post-allogreffe

MO 05/03/2019 clone lymphoïde B CD19+/CD5+ 7 mois post allogreffe : 0.05% des cellules médullaires



MO 22/08/2019 clone lymphoïde B CD19+/CD5+ 1 3 mois post allogreffe: indétectable



NB: On peut évoquer une MRD + si au moins 20 éléments clusterisés dans une fenêtre d'intérêt



Maladie résiduelle minime 1 an post-allogreffe



donneur

1883-17736.R [redacted] 2-190-021 Monoie 22/08/19



Receveur pré-greffe

1883-17736.R [redacted] 2-190-021 Monoie 22/08/19

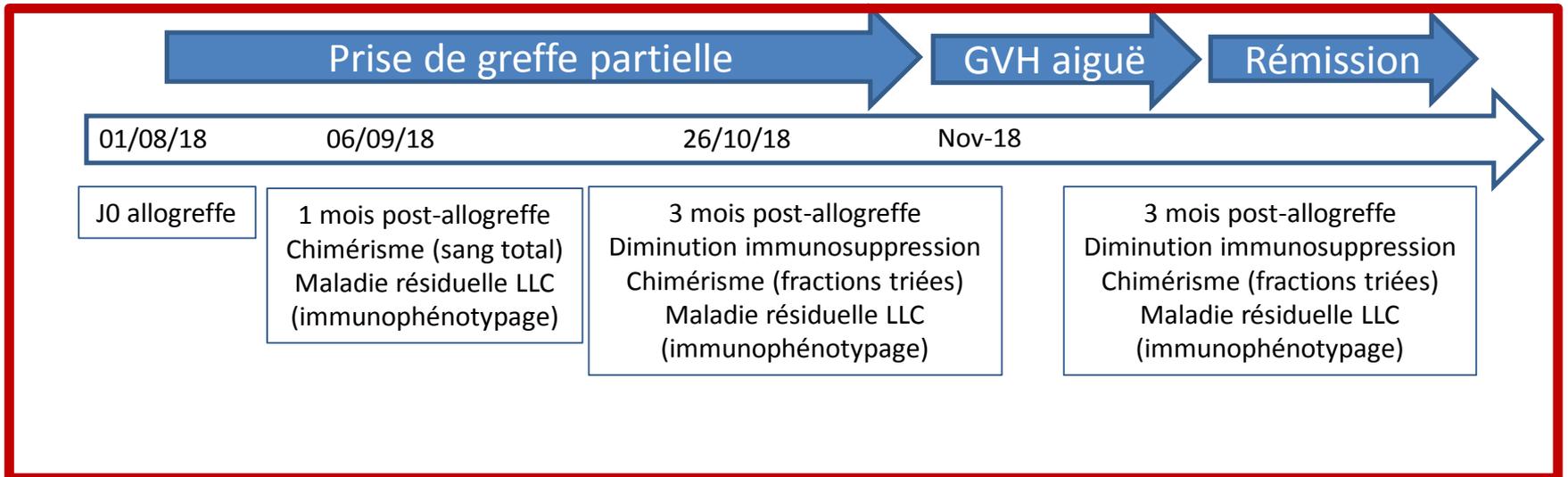
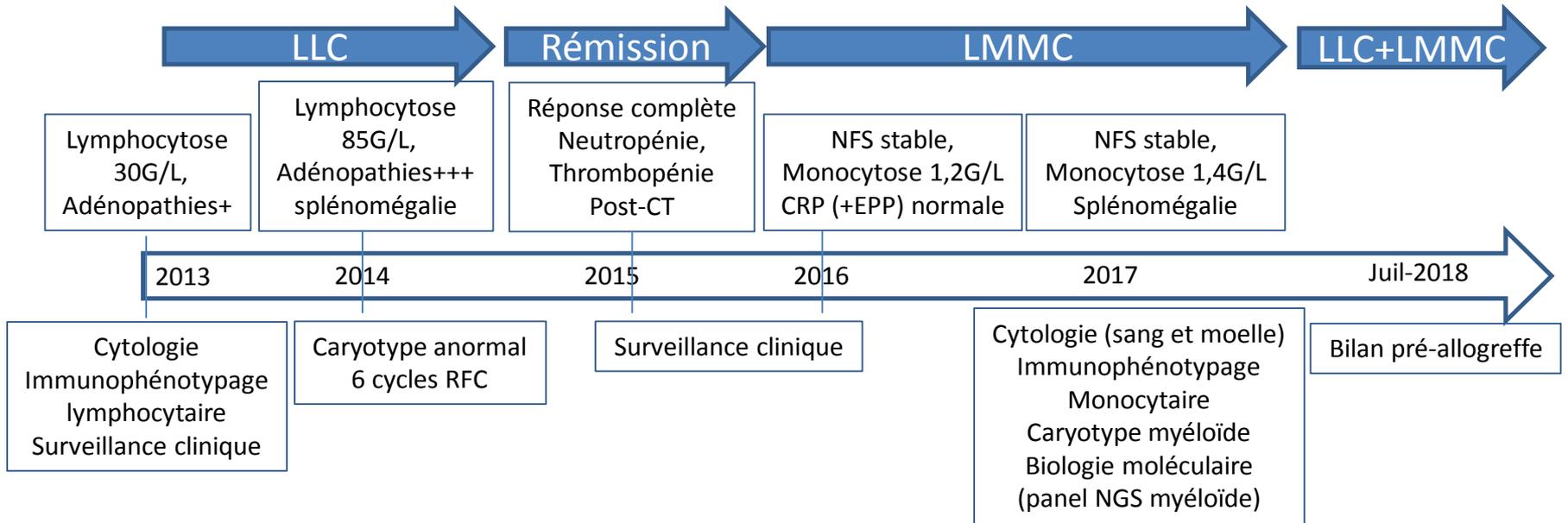


Receveur post-greffe



Chimérisme complet donneur 1 an post-allogreffe

# EPILOGUE..., LA VIE CONTINUE!



# Perspectives

- ❖ Hématologie cellulaire: pluridisciplinarité & chaîne de compétence
- ❖ Penser nos stratégies de dépistage au quotidien (middleware)
- ❖ Imagerie intégrée: un petit pas vers l'intelligence artificielle
- ❖ Vers des cytomètres couplés à l'analyse cytologique?
- ❖ Biologie: fer de lance de la médecine de précision, au service des patients