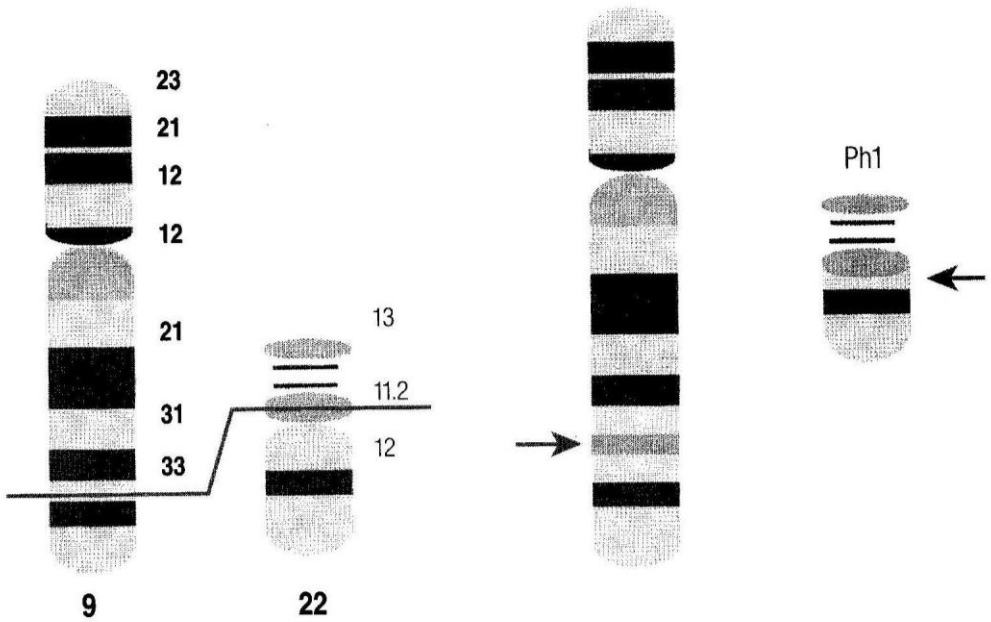
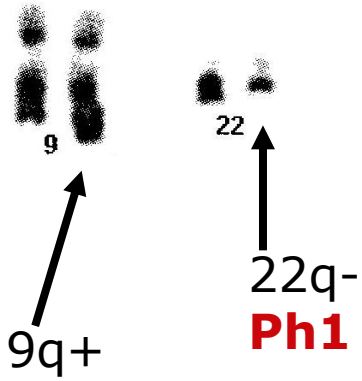
Cinétique de la maladie résiduelle dans la LMC après allogreffe de CSH a conditionnement myelo-ablatif et non myelo-ablatif.

F.Harieche, W.Assouak, R.Ahmed Nacer, M.Benakli, A.Talbi, R.Belhadj, F.Mehdid, F.Zerhouni, R.M.Hamladji.

Leucémie Myéloïde Chronique
Chromosome Philadelphie: Ph1

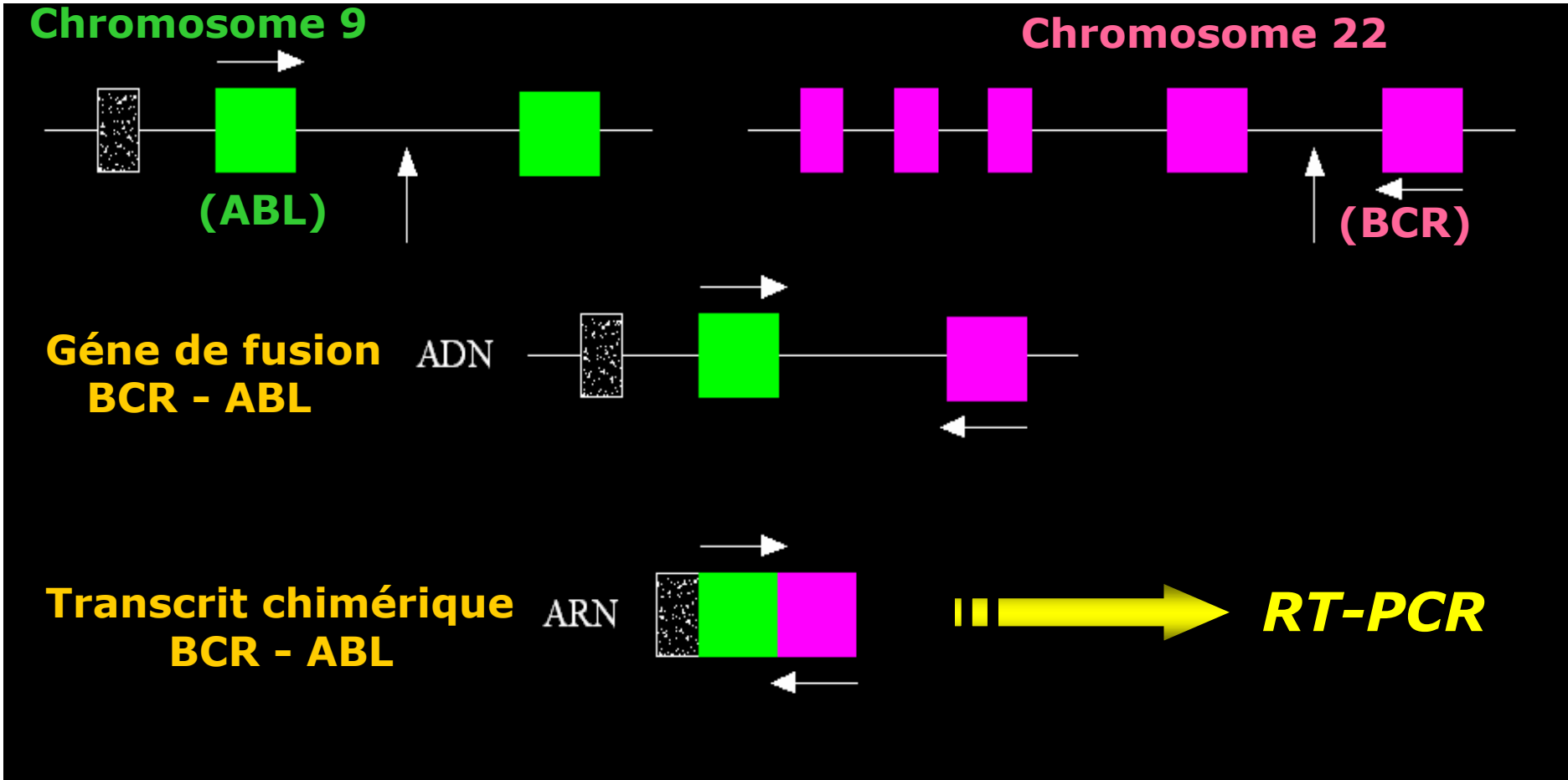
Translocation (9;22)(q34;q11)



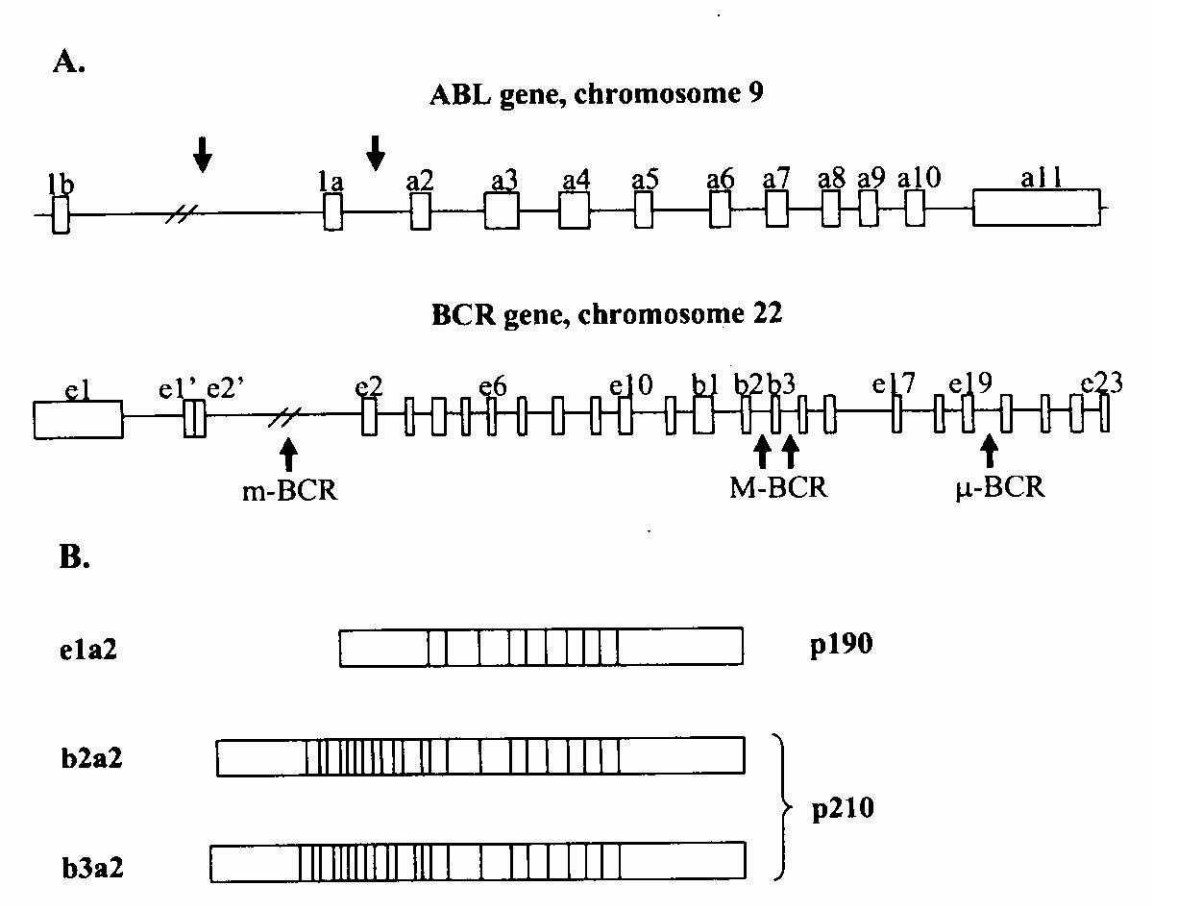


Leucémie Myéloïde Chronique

Translocation (9;22)(q34;q11)



Leucémie Myéloïde Chronique

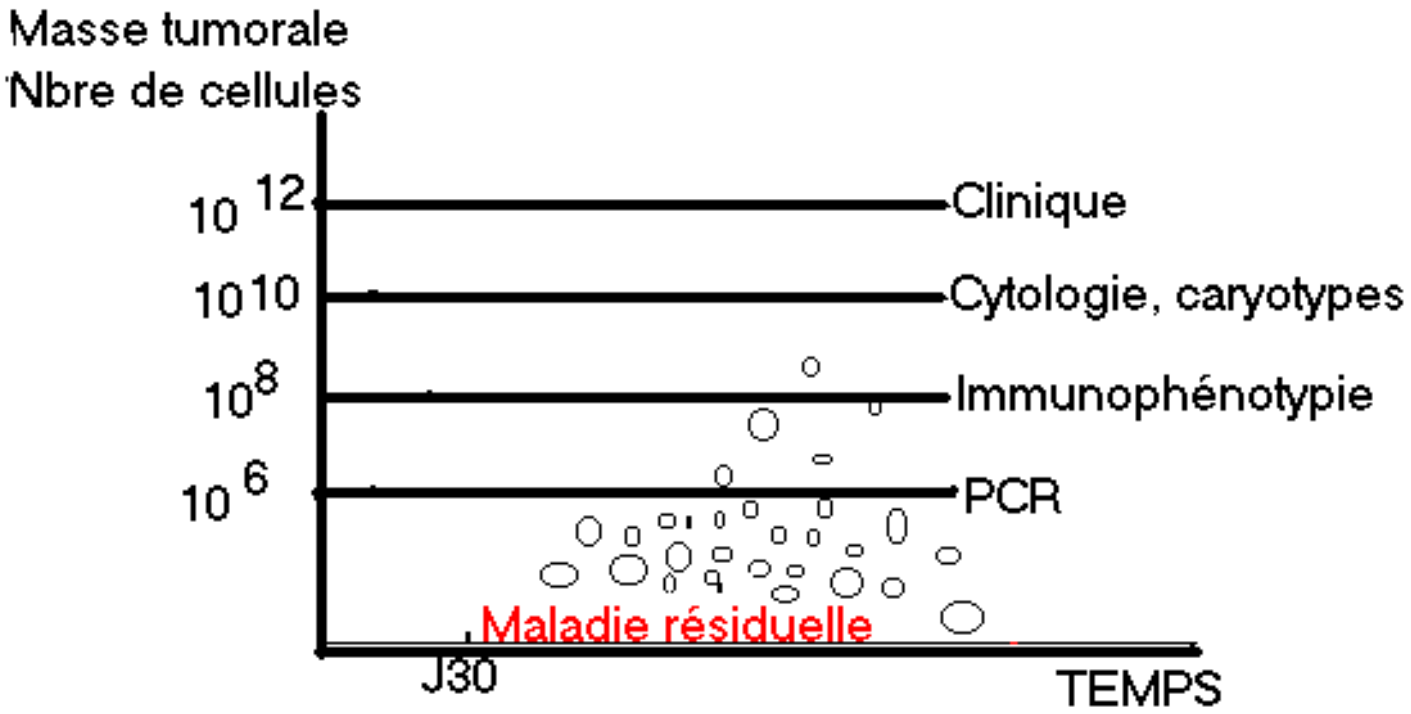


Transcrit BCR-ABL = Ph1

- Marqueur génique
- Spécifique cellules tumorales
- Stable au cours de l`evolution

Cible de choix suivi maladie résiduelle.

Qu`est –ce que la maladie résiduelle?



La persistance de cellules tumorales dans l ’organisme, **non détectées** par les techniques conventionnelles, constitue la maladie résiduelle.

La greffe de moelle osseuse

- Donneur HLA compatible
- Seul traitement curateur LMC

Disparition **complète** et **durable** du transcrit BCR-ABL.

cependant:

- ***Toxicité***:conditionnement myeloablatif
  (non myeloablatif = effet GVL)
- ***Rechutes***: 20 -60% des cas.

Détection précoce → intervention thérapeutique
(échelle moléculaire) (MRD faible)

Suivi maladie résiduelle

- 84 patients LMC: (Janv. 2004 – Dec 2006)
  - 71 phase chronique
  - 13 phase accélération
  - Bilan pré-greffe (HU).
- Greffe de CSH: service Hémato-GMO du Centre Pierre et Marie Curie –Alger.
- 2 protocoles de conditionnement:
  - Myeloablatif (GMA): 25 patients.
  - Non myeloablatif (GNMA): 59 patients.
- Suivi MRD:
  - Tous les 3 mois:j+90, j+180, j+210 et j+365
  - Tous les six mois.

Patients.

	Ensemble	GMA	GNMA
Sexe –ratio h/f	0.82	1.77	0.59
Age (médiane)	31 [4.5 – 55]	18 [4.5 – 36]	35 [22 –55]
Délai Dc –GMO (mois)	9 [3 – 25]	8 [3 – 25]	10 [4 – 18]
Suivi médian (mois)	24 [14 – 38]	24 [14 – 38]	24 [14 – 38]

Méthodes: qRT-PCR temps réel

- Quantification BCR-ABL: TaqMan

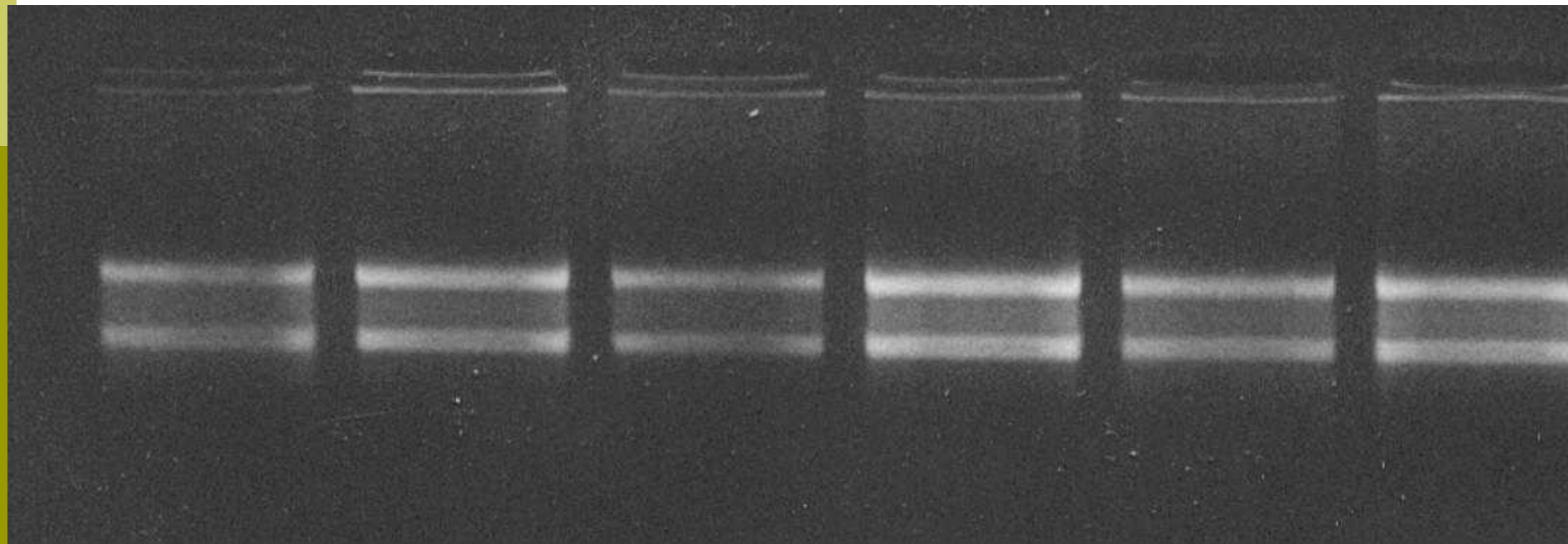
- Sang total: EDTA
  traités rapidement: ARN fragiles.
- 3 étapes:
- Etape1: préparation des ARN.
- Etape2: phase RT (reverse transcription) cDNA
- Etape3: - PCR diagnostic: Biomed:
  *Recherche du transcrit BCR-ABL
  *type b2a3, b3a2 …
  - PCR quantitative en temps réel: si patient informatif au diagnostic.

Étape 1: ARN

Trizol selon la méthode de Chomczynski and Sacchi.

Control:

- *Qualitatif*: migration sur gel: 18S; 28S.
- *Quantitatif*: spectro U.V: DO260/DO280 ~**1,8**



Étape 2: Reverse transcription

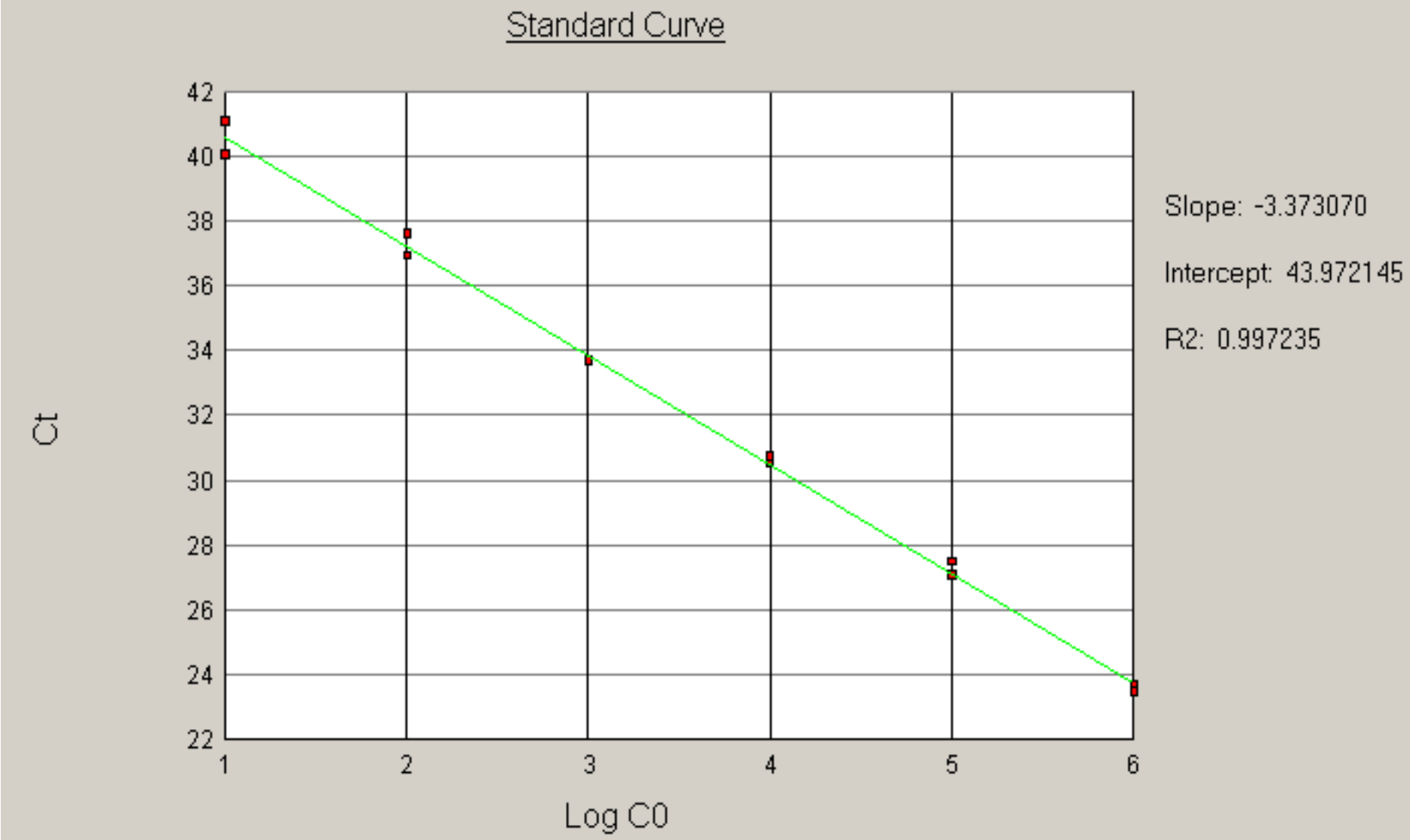
- ARN copiés en ADN: enzyme spécifique des rétrovirus: Transcriptase inverse.

- Protocole EAC:
  - 1ug d`ARN pour un vf de 20ul
  - Copies d`ADNc : **Q-PCR.**

Étape 3: PCR quantitative en temps réel

- ABI 7000 (applied BioSystems).
- Set Taqman: - amorces: ENF 501
  ENR 561
  - sonde: ENP 541
- PCR: 50°C/2min
  95°C/ 10min
  45 cycles (95°C/ 15s 60°C /1min)

Droite d'étalonnage Lignée K562



Normalisation des résultats

Gène de ménage: ubiquitaire et non régulé.
(expression constante types cellulaires)

Contrôle d`amplification in vitro: gène **Abelson.**

Référentiel ARN (lignée):

Index de Qualité: **$IQ=10^{(DCt)/3.3}$**

DCt=Ct échantillon – Ct théorique idéal gène contrôle

Nbre copies = $IQx10^6$

Résultats: équivalent de dilution de lignée:

10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}.

Seuil de sensibilité: 10^{-5}.

Interprétation:

- *Rémission moléculaire :*

MRD négative: BCR-ABL <10-5 sur deux prélèvements successifs a 1mois d`intervalle.

- *Rechute moléculaire :*

Augmentation BCR-ABL >2 log entre deux prélèvements successifs.

Résultats

Diagnostic: pre-greffe:

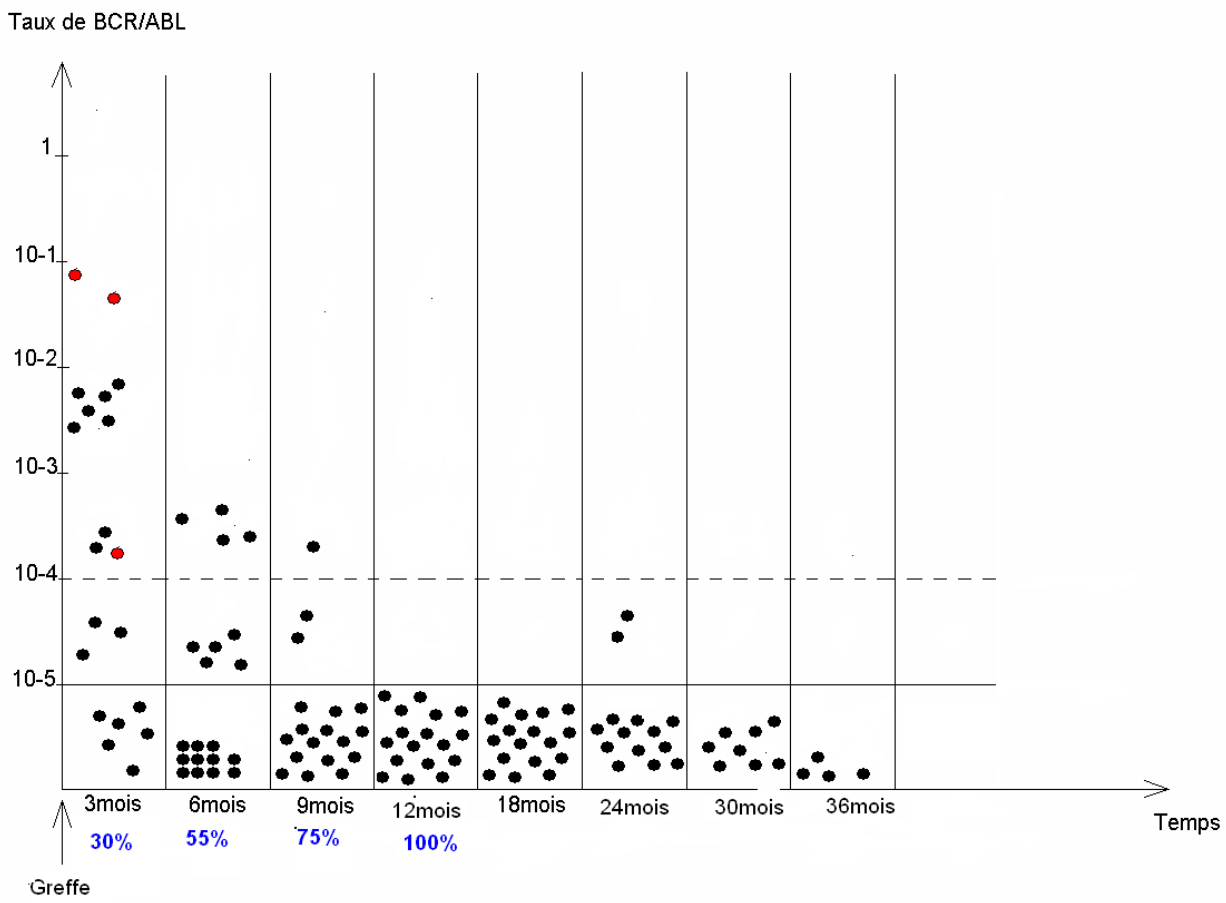
- 81/84 (96%) BCR-ABL+.

  b2a2: 35 (43%) vs 40% lit.

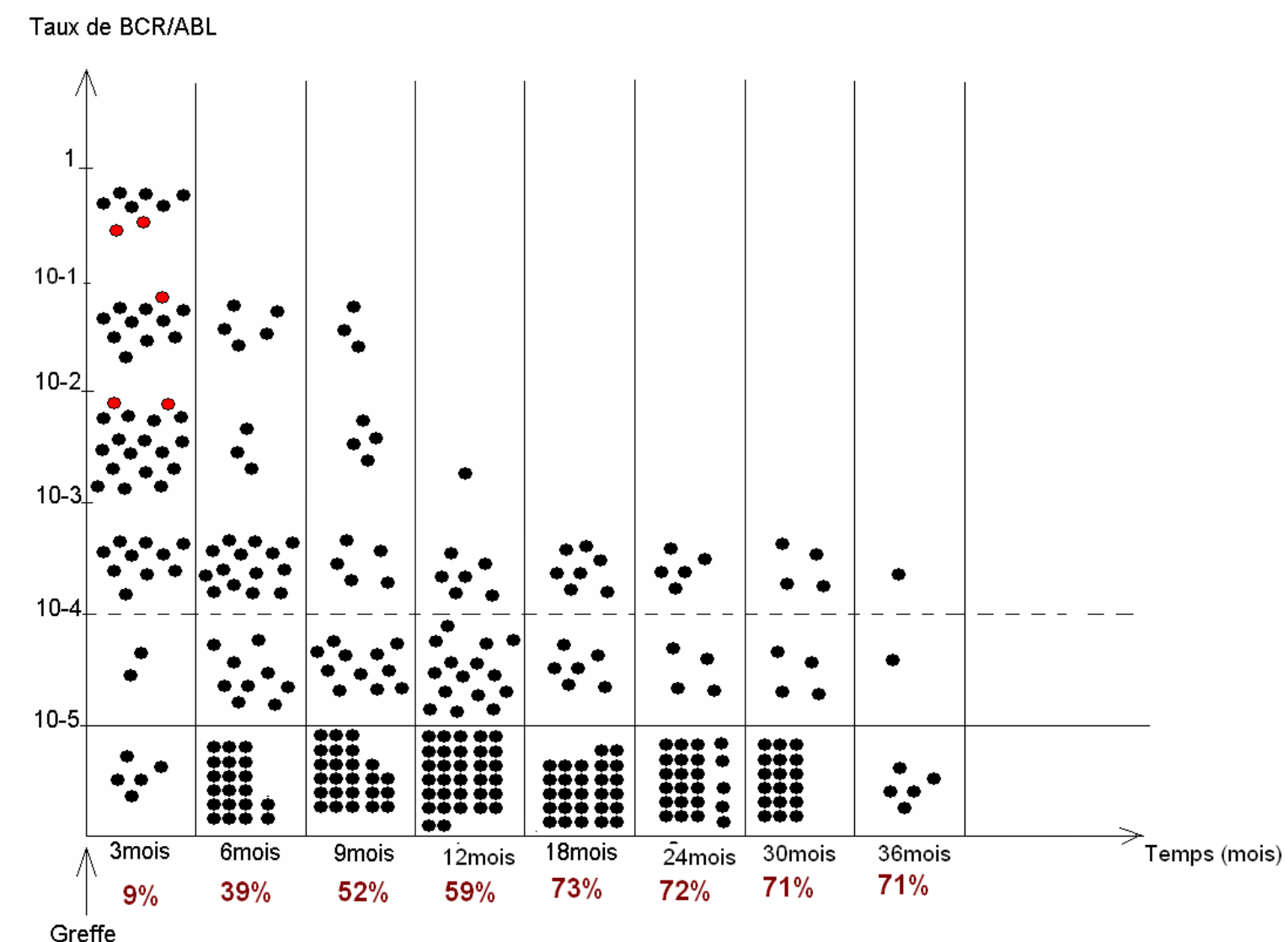
  b3a2: 45 (56%) vs 55% lit.

  1double (b2a2+b3a2).
- 3/84 BCR-ABL neg: Taqman:
  - 2 positifs (10-2)
  - 1 négatif: LMC?

GMA: N=20 évaluables (5DC GVH aigue)

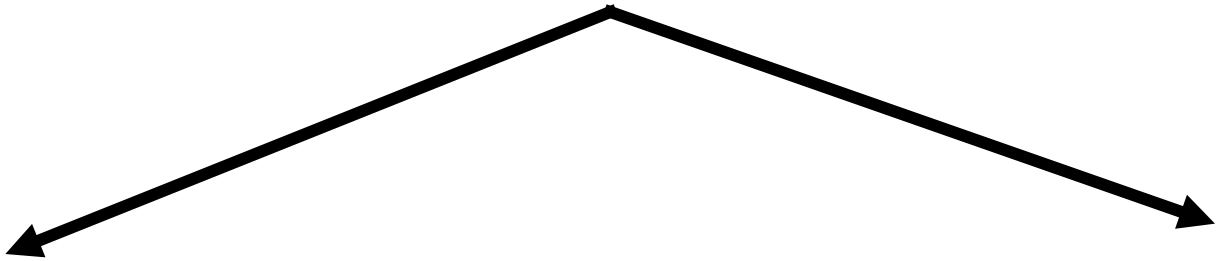


GNMA: N=55 (4 DC GVH aigue).



Rechutes

- 8 patients/75 évaluables **(10%)**



3/20 GMA (15%)

5/55 GNMA (9%)

Rechute moléculaire précédé la rechute clinique:

Délai médian: 3 mois

Rechutes / MRD J+90

GMA

MRD J+90	<=10-4	>10-4	total
rechutes	1	**2**	3
pas de rechute	12	5	17
total	13	7	20

GNMA

MRD J+90	<=10-4	>10-4	total
rechutes	0	**5**	5
pas de rechute	17	33	50
total	17	38	55

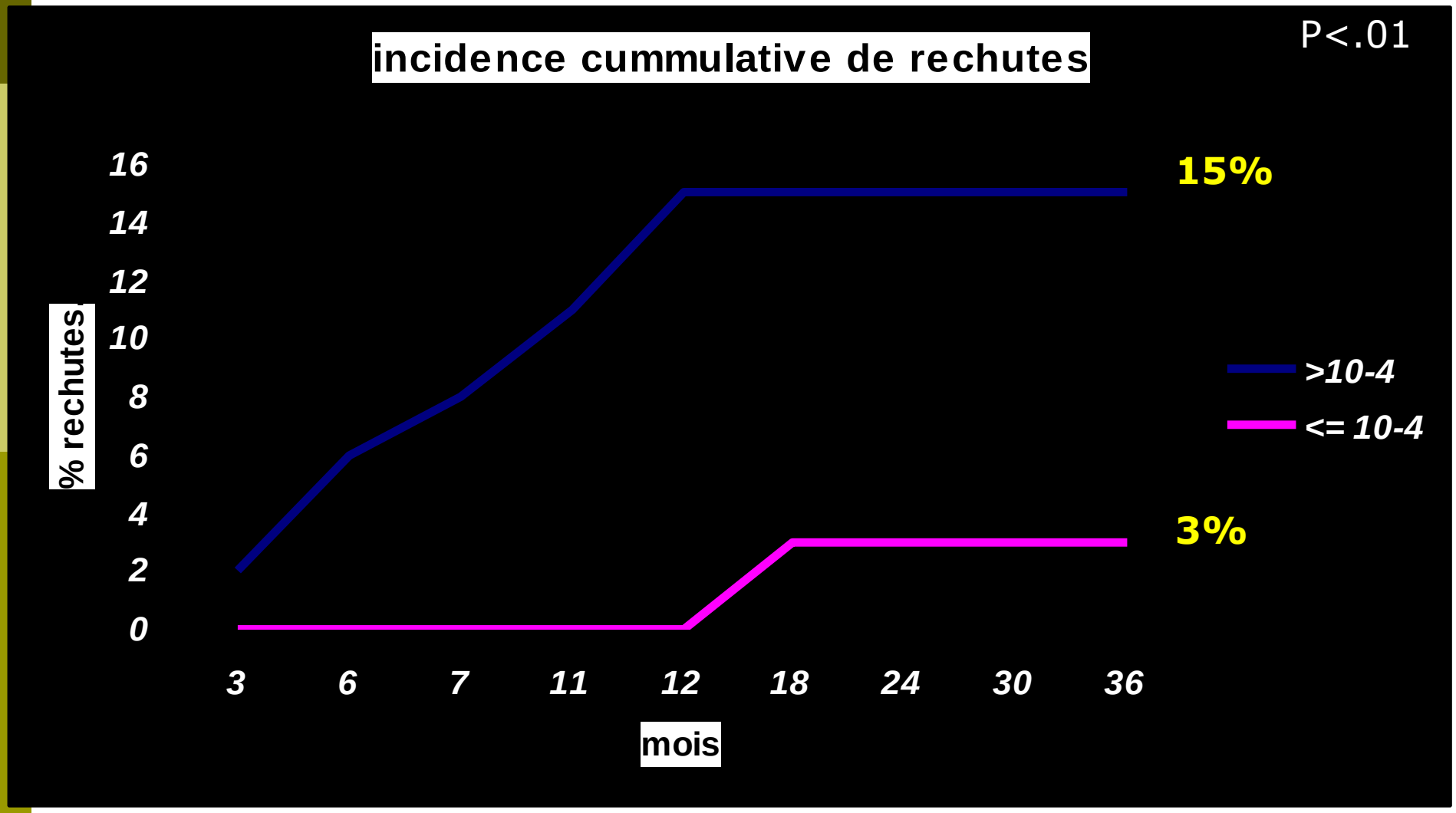
GMA+GNMA

MRD J+90	<=10-4	>10-4	total
rechutes	1	**7**	8
pas de rechute	29	38	67
total	30	45	75

Rechutes / MRD 3 mois: 2 groupes

MRD J+90	<=10-4	>10-4	Total
rechutes	1 (3%)	**7 (15%)**	8
pas de rechute	29	38	67
total	30	45	75

Rechutes / MRD 3 mois



Rechutes / GVH -1-

GMA: *14/20 (**70%**) GVH+*

	Rechutes	Pas de rechutes	Total
GVH +	1 (7%) GVHc NE	13	14
GVH -	**2 (30%)**	4	6
Total	3	17	20

Rechutes et GVH -2-

- ***GNMA: 47/55 GVCH+ (85%)***

	Rechutes	Pas de rechutes	Total
GVH +	**0**	47	47
GVH -	**5 (62%)**	3	8
Total	5	50	55

GVH = effet GVL: protège des rechutes.

commentaires

- Clearance BCR-ABL plus rapide GMA:
  30% a 3 mois vs 9% GNMA
- GMA: 100% des patients neg 1an.RM plus rapide
- GNMA: Expression tardive de BCR-ABL: 36mois (BCR-ABL<10-4); signification?
- Taux de BCR-ABL a 3 mois: valeur prédictive de rechute:
  - MRD neg a 3 mois : rémission.
  - Taux de rechutes élevé 15% BCR-AB 3 mois>10-4. ($p<0.01$)

conclusion

- Quantification BCR-ABL: suivi de MRD LMC après allogreffe de CSH
- Détection rechutes moléculaires qui annoncent rechutes hématologiques
- Intervention thérapeutique plus rapide:

(DLI, Imatinib …)+ efficaces masse tumorale réduite.

- PCR en temps réel: technique rapide
  fiable
  sensible

Résultats conditionnés qualité de l`ARN vulnérable.