

26^e CONGRÈS

AFC

Association Française de Cytométrie



La Région
Occitanie
Pyrénées - Méditerranée

CYTOMÉTRIE 2023



LIVRE
DES RÉSUMÉS

Centre de Congrès
Pierre Baudis

AFC

Association Française de Cytométrie

Programme - Résumés des communications

Liste des posters - Listes des participants, des exposants & sponsors



BIENVENUE

Cher(e)s ami(e)s et collègues,

Toulouse et la Région Occitanie sont heureuses d'accueillir le **26^e congrès de l'Association Française de Cytométrie (AFC)** qui se déroulera les **15, 16 et 17 novembre 2023 au Centre des Congrès Pierre Baudis** dans un environnement verdoyant, au cœur de la ville rose à seulement 10 minutes à pied de la Place du Capitole et de la Basilique Saint Sernin. De nombreux ateliers pratiques seront aussi organisés le 14 novembre, animés par des cytométristes locaux et nationaux.

Le programme offrira un large éventail de conférences et la possibilité d'échanger aussi bien d'un point de vue scientifique que technique autour de différentes thématiques fondamentales et cliniques. L'état de l'art en cytométrie sera mis en avant, couvrant les champs de la cytométrie qu'elle soit conventionnelle, de masse ou spectrale. Les approches en imagerie et imagerie en flux seront également abordées. Une attention particulière sera portée cette année sur les questions de biosécurité et de démarche environnementale. Enfin, par cette manifestation, nous voulons mettre en lumière la recherche scientifique locale et régionale dans les domaines de la cancérologie, l'infectiologie, l'inflammation et le métabolisme. Un accent sera mis sur des thématiques spécifiques telles que l'étude du vieillissement et les pathologies liées au sexe.

Comme lors des éditions précédentes, les jeunes cytométristes seront mis en avant à travers la présentation de leurs travaux de recherche dans une session plénière qui leur sera dédiée. Les meilleures présentations seront récompensées par un prix « Jeune cytométriste ».

Nos partenaires industriels vous proposeront une exposition diversifiée et auront la possibilité de communiquer sur leurs nouveautés techniques et scientifiques.

Ce congrès sera pour vous l'occasion de découvrir ou re-découvrir notre région : Toulouse occupe une situation privilégiée dans le sud-ouest de la France, à travers son histoire, son architecture et sa gastronomie ; sans oublier que la ville rose est aussi la capitale de la violette, du rugby, de l'aéronautique et de l'espace. Notre programme social vous emmènera à la découverte de tous ses trésors !

Nous sommes impatients et impatientes de vous accueillir à Toulouse !

*Alexia Zakaroff et Fatima-Ezzahra L'Faqihi
pour le Comité Local d'Organisation*

LES COMITÉS

COMITÉ D'ORGANISATION

- *Présidente de l'AFC* : Catherine Blanc
- *Responsable événement* :
Fatima-Ezzahra L'Faqihi (INFINITY)
- *Trésorière* : Muriel Andrieu
- *Trésorière adjointe* : Alexia Zakaroff (I2MC)
- *Secrétaire* : Manon Farcé (CRCT)

COMITÉ D'ORGANISATION

- Valérie Duplan (INFINITY)
- Anne-Laure Iscache (INFINITY)
- Delphine Lestrade (TWB)
- Emmanuelle Naser (IPBS)
- Marie-Laure Renoud (RESTORE)
- Élodie Riant (I2MC)

COMITÉ SCIENTIFIQUE LOCAL

- Anne Bouloumié (I2MC)
- Victorine Douin (RESTORE)
- Valérie Duplan (INFINITY)
- Manon Farcé (CRCT)
- Anne-Laure Iscache (INFINITY)
- Frédéric Lagarrigue (IPBS)
- Fatima-Ezzahra L'Faqihi (INFINITY)
- Delphine Lestrade (TWB)
- Emmanuelle Naser (IPBS)
- Laurent Reber (INFINITY)
- Marie-Laure Renoud (RESTORE)
- Élodie Riant (I2MC)
- Ludovic Martinet (CRCT)
- Emmanuel Treiner (INFINITY)
- François Vergez (IUCT)
- Alexia Zakaroff (I2MC)

COMITÉ SCIENTIFIQUE AFC

- Muriel Andrieu
- Catherine Blanc
- Nicolas Chapuis
- Anne-Sophie Chrétien
- Aida Meghraoui-Keddar
- Florent Raffin
- Julie Cazareth
- Samuel Granjeaud
- Marielle Bouix

Secrétariat scientifique

Association Française de Cytométrie (AFC)

3 boulevard Saint-Germain
75005 Paris - France
Tél. : +33 4 67 03 03 00

contact@afcytometrie.fr - <https://afcytometrie.fr>

Secrétariat administratif

Alpha Visa Congrès / AFC 2023

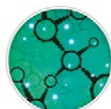
624 rue des Grèzes
34070 Montpellier - France
Tél. : +33 4 67 03 03 00

Inscriptions, hébergement : afc@alphavisa.com
Sponsoring et exposition : afc-spr@alphavisa.com
www.alphavisa.com/afc/2023

REMERCIEMENTS

Le Comité Local d'Organisation et le CA de l'AFC **remercient vivement les sociétés savantes partenaires & partenaires académiques et les partenaires sponsors publics / privés** pour leur soutien dans le cadre du 26^e congrès annuel de l'AFC.

Sociétés savantes partenaires & partenaires académiques



Partenaires sponsors publics / privés



Presse



REMERCIEMENTS

Le Comité Local d'Organisation et le CA de l'AFC **remercient vivement les exposants / sponsors**, pour leur soutien dans le cadre du 26^e congrès annuel de l'AFC.

Exposants / Sponsors



TABLE DES MATIÈRES

PROGRAMME

• Planning	9
• Mercredi 15 novembre	10
• Jeudi 16 novembre	12
• Vendredi 17 novembre	16

RÉSUMÉS DES COMMUNICATIONS DU MERCREDI 15 NOVEMBRE

SESSIONS PLÉNIÈRES

• P1 - Avancées Technologiques	20
<i>Communications affichées</i>	22
• P3 - Jeunes Cytométristes	28
<i>Communications affichées</i>	32
• P4 - Analyse de données	36
• P6 - Différences liées au sexe en physiopathologie	38
• P8 - Voyages dans l'Espace : immunité et métabolisme	40
• P9 - Microbiologie clinique	42

RÉSUMÉS DES COMMUNICATIONS DU JEUDI 16 NOVEMBRE

SESSIONS PARALLÈLES

• SP1 - Cancérologie	44
<i>Communication orale sélectionnée</i>	46
<i>Communications affichées</i>	47
• SP2 - Hématologie clinique 1	
Cytométrie clinique appliquée aux pathologies myéloïdes	49
<i>Communications orales sélectionnées</i>	51
<i>Communications affichées</i>	54
• SP3 - μvésicules/μparticules Session commune avec la FSEV	62
<i>Communication orale sélectionnée</i>	64
• SP4 - Hématologie clinique 2	
Cytométrie clinique appliquée aux pathologies lymphoïdes	65
<i>Communications orales sélectionnées</i>	67
<i>Communications affichées</i>	69
• SP5 - Biosécurité et Environnement	
Labo 1.5 / Biosécurité / Environnement / Développement durable	81

• SP6 - Métabolisme	84
<i>Communications orales sélectionnées</i>	<u>86</u>
<i>Communication affichée</i>	<u>88</u>
<hr/>	
• SP7 - Hématologie clinique 3	
SP7-1 - Utilisation des CAR-T cells en hématologie : aspects cliniques et biologiques	89
SP7-2 - Biosécurité en laboratoire hospitalier	91
• SP8 - Microbiologie 1 Session commune avec la SFM	
Interactions (positives et négatives) plantes-microorganismes	92
<i>Communications orales sélectionnées</i>	<u>94</u>
<i>Communication affichée</i>	<u>96</u>
• SP9 - Immunologie / Infectiologie Session commune avec la SFI	97
<i>Communications orales sélectionnées</i>	<u>99</u>
<i>Communications affichées</i>	<u>103</u>
<hr/>	
• SP10 - Immunologie clinique	110
<i>Communications orales sélectionnées</i>	<u>112</u>
<i>Communication affichée</i>	<u>115</u>
• SP11 - Vieillesse	116
<i>Communication orale sélectionnée</i>	<u>118</u>
• SP12 - Forum Groupe 3C	119
<i>Communication orale sélectionnée</i>	<u>120</u>
<hr/>	
RÉSUMÉS DES COMMUNICATIONS DU VENDREDI 17 NOVEMBRE	
SESSIONS PARALLÈLES	
• SP13 - High Content Cytometry	
Cytométrie de masse, spectrale et conventionnelle	122
<i>Communication orale sélectionnée</i>	<u>124</u>
<i>Communication affichée</i>	<u>125</u>
• SP14 - Microbiologie 2 Session commune avec la SFM	
Autour des microbiotes	126
<i>Communications orales sélectionnées</i>	<u>128</u>
• SP15 - Hématologie clinique 4	
Cytométrie clinique appliquée aux pathologies plaquettaires	130
<hr/>	
• SP16 - High Content Imagerie	
Imagerie et Imagerie en Flux	133
<i>Communications orales sélectionnées</i>	<u>135</u>
<i>Communications affichées</i>	<u>137</u>

- **SP17 - Microbiologie 3** Session commune avec la SFM
 - Pathogènes** **141**
 - Communications orales sélectionnées* **143**
- **SP18 - Hématologie clinique 5**
 - Cytométrie clinique appliquée aux pathologies plasmocytaires** **146**
 - Communication orale sélectionnée* **148**

- **Liste des communications affichées** **149**

- **Liste des participants** **155**

- **Liste des exposants et sponsors** **168**
- **Plan de l'exposition & Liste des stands** **171**

- **Plan de situation des hôtels** **172**

PLANNING AFC 2023

MERCREDI 15 NOVEMBRE

07:45	Accueil des participants
08:30	Ouverture du congrès
09:30	Session plénière
10:30	P1 - Avancées technologiques
11:15	Pause café - Visite de l'exposition - Posters
12:00	P2 - Paroles aux industriels
13:00	Session plénière
14:30	P3 - Jeunes Cytométristes
14:30	Déjeuner
14:30	Visite de l'exposition - Posters
15:30	Session plénière
15:30	P4 - Analyse de données
16:00	P5 - Symposium industriel / RareCyte
16:00	Session plénière
17:00	P6 - Différences liées au sexe en physiopathologie
17:00	P7 - Symposiums industriels
17:45	Cytek
17:45	BD
17:45	Sony
18:30	Pause café - Visite de l'exposition
18:30	Posters session 1 (N° impairs)
19:30	Session plénière
19:30	P8 - Voyages dans l'Espace : immunité et métabolisme
20:00	P9 - Microbiologie clinique
20:00	Cocktail de bienvenue

JEUDI 16 NOVEMBRE

08:15	Accueil des participants
08:45	SP1 - Cancérologie
08:45	SP2 - Hématologie clinique 1
10:15	SP3 - μvésicules/μparticules
10:15	Pause café - Visite de l'exposition
11:00	Posters session 2 (N° pairs)
11:00	SP4 - Hématologie clinique 2
12:30	SP5 - Biosécurité et Environnement
12:30	SP6 - Métabolisme
14:00	Déjeuner
14:00	Visite de l'exposition - Posters
15:30	SP7 - Hématologie clinique 3
15:30	SP8 - Microbiologie 1
15:30	SP9 - Immunologie / Infectiologie
16:15	Pause café
16:15	Visite de l'exposition - Posters
17:45	SP10 - Immunologie clinique
17:45	SP11 - Vieillesse
19:00	SP12 - Forum Groupe 3C
19:00	P10 - Assemblée Générale AFC
19:30	Apéritif et dîner du congrès
19:30	Remise des Prix spécial "Jeune Cytométriste" et des Prix "meilleur poster"

VENREDI 17 NOVEMBRE

08:15	Accueil des participants
08:45	SP13 - High Content Cytometry
08:45	Masse, spectrale et conventionnelle
10:15	SP14 - Microbiologie 2
10:15	SP15 - Hématologie clinique 4
11:00	P11 - Paroles aux industriels
11:00	Pause café
11:45	Visite de l'exposition - Posters
11:45	SP16 - High Content Imagerie
11:45	Imagerie et Imagerie en Flux
13:15	SP17 - Microbiologie 3
13:15	SP18 - Hématologie clinique 5
14:30	Déjeuner
14:30	Caravelle 2, niveau 0
14:30	Fin du congrès

■	Espace Caravelle 1, niveau 0
■	Restauration Caravelle 2, niveau 0
■	Restauration Foyer Ariane, niveau 1
■	Salle Cassiopée, niveau 1
■	Salle Ariane 1&2, niveau 1
■	Salle Spot, niveau 1
■	Salle Argos, niveau 1

PROGRAMME - MERCREDI 15 NOVEMBRE

07:45-08:30 **Accueil des participants** Espace Caravelle 1 - Niv. 0

SESSIONS PLÉNIÈRES

08:30-09:30 **Ouverture du congrès** Salle Cassiopée - Niv. 1

- Mot de la Présidente Catherine Blanc
- Discours des tutelles

09:30-10:30 **P1 - Avancées Technologiques** Salle Cassiopée - Niv. 1*Modératrices : Catherine Blanc (Paris), Aïda Meghraoui-Kheddar (Nice) et Fatima-Ezzahra L'Faqih-Olive (Toulouse)*

- **Designing high parameter panels**
Oliver Burton (Cambridge, UK)
- **Image Cytometry as a tool to deciphering single cell heterogeneity in health and disease**
Andrew Filby (Newcastle, UK)

10:30-11:15 **Pause café - Visite de l'exposition - Posters** Espace Caravelle 1 - Niv. 011:15-12:00 **P2 - Parole aux industriels** Salle Cassiopée - Niv. 1*Modérateurs : Catherine Blanc (Paris) et Florent Raffin (Brétigny-sur-Orge)*

- **BioLegend - New Dyes and Optimized Multicolor Flow Cytometry Panels**
Jean-Baptiste Guillerme (BioLegend)
- **Miltenyi Biotec - MACSQuant Tyto: Make the impossible possible**
Cyril Longé (Miltenyi Biotec)
- **ThermoFisher Scientific - Attune CytPix : La cytométrie comme vous ne l'avez jamais vu**
Marjorie Joiner (Thermo Fisher Scientific)
- **Agilent Technologies - The Cell Analysis Solution**
Jérôme Darakdjian (Product Specialist, Flow Cytometry) &
Damien Brechet (Product Specialist, BioTek Instruments)
- **Vizgen - Highly multiplexed, multi-omic tissue mapping at single-cell resolution with the MERSCOPE spatial biology platform**
Mickael Ploquin (Vizgen)
- **Cytek Biosciences - Le Northern Light-CLC arrive dans les laboratoires de diagnostic : Intérêt de la cytométrie spectrale au service des Hôpitaux Universitaires de Genève**
Sabrina Guenounou (Cytek Biosciences)

12:00-13:00 **P3 - Jeunes Cytométristes** Salle Cassiopée - Niv. 1*Modératrices : Catherine Blanc (Paris), Muriel Andrieu (Paris) et Julie Cazareth (Valbonne)***Communications orales sélectionnées**

- **P3-1 - Suivi en cytométrie en flux des patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 pour lymphome cérébral : Marqueurs et dynamiques de réponse et de toxicité**
Jules Al Samara (Département d'immunologie, AP-HP, Paris, France)
- **P3-2 - Défaut d'activation conformationnelle de l'intégrine LFA-1 dans les lymphocytes CAR-T thérapeutiques**
Clément Bouisset (Équipe 12 - R. Lesourne - L. Dupré, INFINITY, Toulouse, France)
- **P3-3 - Un grand nombre de paramètres implique de grandes responsabilités : comment passer du conventionnel au spectral avec succès en plateforme ?**
Hugo Garnier (Plateau de Cytométrie et Tri Cellulaire, INFINITY, Toulouse, France)
- **P3-4 - 50 nuances de Fluo pour suivre la réponse immunitaire**
Dimitri Popoff (CIML, Marseille, France)


13:00-14:30 **Déjeuner** Espace Caravelle 2 - Niv. 0 & Foyer Ariane - Niv. 1

Café dans l'exposition - Visite de l'exposition - Posters Espace Caravelle 1 - Niv. 0

SESSIONS PLÉNIÈRES

14:30-15:30 **P4 - Analyse de données** Salle Cassiopée - Niv. 1

Modérateurs : Samuel Granjeaud (Marseille) et Anne-Laure Iscache (Toulouse)

- Integrating mass cytometry in reliable multi-omic predictive modeling studies
Julien Hédou (Paris)
-  Dissecting responses to immunotherapy using high-dimensional single-cell analysis
Raphaël Gottardo (Lausanne, Suisse)

15:30-16:00 **P5 - Symposium industriel - RareCyte** Salle Cassiopée - Niv. 1

Modératrices : Catherine Blanc (Paris) et Alexia Zakaroff-Girard (Toulouse)

RARECYTE
Precision Biology for Life Sciences

- Spatial cytometry: mapping the universe at single-star resolution - Coralie Guerin (Paris)




16:00-17:00 **P6 - Différences liées au sexe en physiopathologie** Salle Cassiopée - Niv. 1

Modérateurs : Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive (Toulouse) et Nicolas Fazilleau (Toulouse)

- Caractérisation par cytométrie spectrale de l'hétérogénéité cellulaire dans le liquide péritonéal des patientes atteintes d'endométriose - Françoise Lenfant (Toulouse)
- Régulation de l'immunité innée par les hormones sexuelles - Sophie Laffont-Pradines (Toulouse)

17:00-17:45 **P7 - Symposiums industriels** Salle Cassiopée - Niv. 1

Modérateurs : Catherine Blanc (Paris), Florent Raffin (Brétigny-sur-Orge) et Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive (Toulouse)

- 17:00-17:15 • Cytek Biosciences - Full Spectrum Profiling Technology to handle Multiple Autofluorescence in complex samples - Yacine Kharraz (Cytek Biosciences) 
- 17:15-17:30 • BD - A new view on cytometry - Gert Van Isterdael (Belgique) 
- 17:30-17:45 • Sony - 26-color panel for deep immunophenotyping of HIV-1 infected individuals 
Céline Fombellida-Lopez (University of Liège - GIGA, Belgique)

17:45-18:30 **Pause café - Visite de l'exposition** Espace Caravelle 1 - Niv. 0

Posters session 1 - N° impairs Espace Caravelle 1 - Niv. 0

SESSIONS PLÉNIÈRES

18:30-19:30 **P8 - Voyages dans l'Espace : immunité et métabolisme** Salle Cassiopée - Niv. 1

Modérateurs : Alexia Zakaroff-Girard (Toulouse) et Nicolas Fazilleau (Toulouse)

- Voyages spatiaux et Immunité - Jean-Pol Fripiat (Nancy)
- Voyages spatiaux, muscle et métabolisme - Claire Laurens (Toulouse)

19:30-20:00 **P9 - Microbiologie clinique** Salle Cassiopée - Niv. 1

Modératrices : Sophie Laffont-Pradines (Toulouse) et Catherine Blanc (Paris)

- Cytométrie bactérienne et médecine - Guy Gorochov (Paris)

20:00 **Cocktail de bienvenue** Espace Caravelle 1 - Niv. 0

Sponsorisé par  **BioLegend**
Enabling Legendary Discovery™

PROGRAMME - JEUDI 16 NOVEMBRE

08:15-08:45 **Accueil des participants** Espace Caravelle 1 - Niv. 0

SESSIONS PARALLÈLES

08:45-10:15 **SP1 - Cancérologie** Salle Ariane 1&2 - Niv. 1**Modérateurs :** Ludovic Martinet (Toulouse) et Frédéric Lagarrigue (Toulouse)

- **Impact de la reprogrammation du métabolisme du céramide sur les lymphocytes infiltrants la tumeur et la réponse à l'immunothérapie**
Céline Colacios (Toulouse)

- **Les vaisseaux HEV : des vaisseaux sanguins spécialisés qui permettent aux lymphocytes d'accéder aux tumeurs pendant l'immunothérapie**
Jean-Philippe Girard (Toulouse)

Communication orale sélectionnée

- **SP1-1 - Deciphering tumor-specific T cells in Acute Myeloid Leukemia**
Yannick Simoni (Hématopoïèse normale et pathologique, Institut Cochin, Paris, France)

08:45-10:15 **SP2 - Hématologie clinique 1** Salle Spot - Niv. 1**Cytométrie clinique appliquée aux pathologies myéloïdes****Modératrices :** Valérie Bardet (Paris) et Oriane Wagner Ballon (Paris)

- **Les mastocytoses et leur diagnostic : qui, quand, quoi, où, comment ?**
Ludovic Lhermitte (Paris)

- **CALCRL : un nouveau marqueur des cellules souches leucémiques et cible thérapeutique pour lutter contre les rechutes dans les leucémies aiguës myéloïdes**
Nathan Guiraud (Toulouse)

Communications orales sélectionnées

- **SP2-1 - Analyse par cytométrie en flux du dépôt de C3d sur les hématies de patients HPN traités par inhibiteurs de la fraction C5 du complément**
Agathe Debliquis (Laboratoire d'Hématologie, Groupe Hospitalier de la région Mulhouse Sud alsace (GHRMSA), Mulhouse, France)
- **SP2-2 - Les rares cellules présentant un déficit en protéines GPI-liées peuvent être considérées comme un véritable clone HPN selon les données de l'Observatoire National des clones HPN**
Magali Le Garff-Tavernier (Service Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP Sorbonne Université, Paris, France)

08:45-10:15 **SP3 - μvésicules/μparticules** Session commune avec la FSEV Salle Argos - Niv. 1**Modératrices :** Steffi Bosch (Nantes) et Cécile Malnou (Toulouse)

- **Detection of Tumor-derived Extracellular Vesicles interactions with Immune cells is dependent on EV-labelling methods**
Luisa Loconte (Italie)

- **Le complexe dendrogénine A/LXRβ différencie les cellules tumorales pour libérer de petites vésicules extracellulaires immunogènes anti-tumorales enrichies en exosomes**
Julio Bunay (Toulouse)

Communication orale sélectionnée

- **SP3-1 - La cytométrie en flux pour étudier l'interaction entre périlipines et gouttelettes lipidiques**
Julie Cazareth (Université Côte d'Azur - CNRS IPMC UMR7275, Valbonne, France)

10:15-11:00 **Pause café - Visite de l'exposition** Espace Caravelle 1 - Niv. 0**Posters session 1 - N° pairs** Espace Caravelle 1 - Niv. 0

SESSIONS PARALLÈLES

11:00-12:30

SP4 - Hématologie clinique 2

Salle Spot - Niv. 1

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies lymphoïdes

Modérateurs : Ludovic Lhermitte (Paris) et Magali Le Garff Tavernier (Paris)

- **Quelle place pour la cytométrie en flux des leucémies aigües lymphoblastiques en 2023 ?**
Isabelle Arnoux (Marseille) et Ludovic Lhermitte (Paris)
- **Utilisation d'un arbre de décision hybride pour identifier les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B**
Inès Vergnolle (Toulouse)

Communications orales sélectionnées

- **SP4-1 - Le CD25 : un marqueur de transformation des lymphomes T cutanés ?**
Vincent Arzul (Hôpital Henri Mondor, Créteil, France)
- **SP4-2 - Étude comparative des dosages de l'IL-10 et IL-6 par Cytometric Bead Array (CBA) sur FACSCanto II et Navios Ex dans le cadre du diagnostic et du suivi des Lymphomes Oculo-Cérébraux (LOC)**
Léane Gerber (Laboratoire d'Hématologie, Groupe Hospitalier de la région Mulhouse Sud Alsace, Mulhouse, France)

11:00-12:30

SP5 - Biosécurité et Environnement

Salle Ariane 1&2 - Niv. 1

Labo 1.5 / Biosécurité / Environnement / Développement durable

Modératrices : Peggy Sanatine (Évry) et Emmanuelle Näser (Toulouse)

- **Enjeux éthiques et sociétaux de la responsabilité environnementale de la recherche**
Emmanuelle Rial-Sebbag (Toulouse)
- **Labos 1point5 et partage d'expérience d'un laboratoire en transition**
Muriel Andrieu (Paris)
- **Retour et perspectives du groupe Biosécurité et environnement de l'AFC**
Peggy Sanatine (Évry) et Emmanuelle Näser (Toulouse)
- **Table ronde : Démarche environnementale**

11:00-12:30

SP6 - Métabolisme

Salle Argos - Niv. 1

Modérateurs : Jean Nakhle (Toulouse) et Anaïs Briot (Toulouse)

- **Characterizing metabolic intratumoral heterogeneity using mass cytometry**
Lucille Stuan (Montpellier)
- **Rôle de la microcirculation des dépôts adipeux dans l'adaptation aux transitions énergétiques**
Anaïs Briot (Toulouse)

Communications orales sélectionnées

- **SP6-1 - Investigating the metabolic profile of immune and non-immune cells in solid tumor by imaging mass cytometry**
Henri-Alexandre Michaud (Immunité et Cancer, Institut de Recherche en Cancérologie, Montpellier, France)
- **SP6-2 - Single-Cell Metabolic Analysis in Leukemia by Mass-cytometry**
Yannick Simoni (Hématopoïèse normale et pathologique, Institut Cochin, Paris, France)

12:30-14:00

Déjeuner

Espace Caravelle 2 - Niv. 0 & Foyer Ariane - Niv. 1

Café dans l'exposition - Visite de l'exposition - Posters

Espace Caravelle 1 - Niv. 0

SESSIONS PARALLÈLES

- 14:00-15:30** **SP7 - Hématologie clinique 3** *Salle Spot - Niv. 1*
- 14:00-15:00** **SP7-1 - Utilisation des CAR-T cells en hématologie : aspects cliniques et biologiques** 
- Modérateurs :** Nicolas Chapuis (Paris) et François Vergez (Toulouse)
- **Actualités sur les cellules CAR-T**
Pierre Bories (Toulouse)
 - **Suivi biologique des CAR-T**
Mikael Roussel (Rennes)
- 15:00-15:30** **SP7-2 - Biosécurité en laboratoire hospitalier**
- Modératrice :** Julie Cazareth (Valbonne)
- **Évaluation des Pratiques en Biosécurité dans les laboratoires de biologie médicale utilisant la cytométrie en flux. Résultats d'une Enquête Nationale**
Retour du questionnaire Biosécurité clinique et Table ronde
Christophe Parizot (Paris) et Victoria Ragueneau (Versailles)
-
- 14:00-15:30** **SP8 - Microbiologie 1** *Session commune avec la SFM* *Salle Argos - Niv. 1*
- Interactions (positives et négatives) plantes-microorganismes** 
- Modérateurs :** Mickaël Bourge (Paris) et Claire Saulou (Versailles-Grignon)
- **Identification de protéines microbiennes à partir de noyaux triés de racines de légumineuses infectées par un parasite tellurique**
Laurent Camborde (Toulouse)
 - **Flow cytometry: a versatile tool to understand the biology of legume-rhizobium symbiosis**
Benoit Alunni (Paris)
- Communications orales sélectionnées**
- **SP8-1 - Étude de la bactérie *Cupriavidus necator* pour une application spatiale en support vie : Utilisation de la cytométrie en flux pour caractériser la composition de la biomasse**
Pierre Joris (TBI, INSA de Toulouse, Toulouse, France)
 - **SP8-2 - Characterization of plasmid expression level heterogeneity, at single cell level, through heterologous eGFP expression in co-expression with recombinant isopropanol production in *Cupriavidus necator***
Pauline Pijpstra (INSA Toulouse, Toulouse, France)
-
- 14:00-15:30** **SP9 - Immunologie / Infectiologie** *Session commune avec la SFI* *Salle Ariane 1&2 - Niv. 1*
- Modérateurs :** Julie Tabiasco (Toulouse) et Laurent Reber (Toulouse) 
- **Role of the transcription factor Eomes in chronic inflammatory diseases**
Anne Dejean (Toulouse)
 - **Mécanisme et potentielle thérapie du choc anaphylactique**
Laurent Reber (Toulouse)
- Communications orales sélectionnées**
- **SP9-1 - Impact du stress prénatal maternel sur la programmation à long terme des Lymphocytes T CD4+**
Rébecca Barascud (INSERM, INFINITY, Toulouse, France)
 - **SP9-2 - Workflow d'analyse de données de cytométrie de flux totalement automatisé pour évaluer les effets de candidats adjuvants sur les compartiments de cellules B et T mémoires dans un essai clinique de phase I**
Julien Nourikyan (ALTRABIO, Lyon, France)
 - **SP9-3 - Deciphering the Functional Heterogeneity of Cytotoxic T Lymphocytes**
Roxana Khazen (Cancer research center of Toulouse, Inserm U1037, Toulouse, France)
 - **SP9-4 - Utilisation de techniques de biologie des systèmes pour une analyse détaillée de la réponse immunitaire au vaccin à ARN messenger BNT162b2 chez les patients ayant bénéficié d'une allogreffe**
Oswin Kwan (Hématologie - GIGA I3, Université de Liège, Liège, Belgique)
-
- 15:30-16:15** **Pause café - Visite de l'exposition - Posters** *Espace Caravelle 1 - Niv. 0*

SESSIONS PARALLÈLES

16:15-17:45

SP10 - Immunologie clinique

Salle Ariane 1&2 - Niv. 1

Modérateurs : Emmanuel Treiner (Toulouse) et Maha Ayyoub (Toulouse)

- **Caractérisation de la réponse lymphocytaire T et B par cytométrie spectrale dans le rejet en transplantation rénale**
Kevin Louis (Paris)
- **Les lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux : la pierre angulaire de la réponse aux immunothérapies par blocage des points de contrôle immunitaire**
Maha Ayyoub (Toulouse)

Communications orales sélectionnées

- **SP10-1 - Modification de l'expression des Antigènes HLA-DR et CD64 des leucocytes humains par cytométrie en flux : marqueurs fiables de survenue du sepsis chez les patients en réanimation ?**
Sara Addakiri (Faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca Université Hassan 2, Casablanca, Maroc)
- **SP10-2 - Leveraging whole blood-based functional flow cytometry assays to stratify and monitor rheumatoid arthritis patients**
Celia Cartagena García (Beckman Coulter Life Sciences, Research Department, Marseille, France)
- **SP10-3 - Le Pexidartinib, un inhibiteur de CSF-1R, impacte la différenciation des cellules dendritiques en inhibant la signalisation de FLT3 chez les patients traités par anti-PDL-1 - résultats d'une étude de phase 1**
Céline Rodriguez (Lab. d'Immunothérapie du Cancer de Lyon (LICL), Centre Léon Bérard/CRCL, Lyon, France)

16:15-17:45

SP11 - Vieillesse

Salle Spot - Niv. 1

Modératrices : Victorine Douin (Toulouse) et Anne Bouloumié (Toulouse)

- **CD36 contribue au processus métastatique et à la rechute des leucémies aiguës myéloïdes**
Jean Nakhle (Toulouse)
- **Impact de l'immuno-sénescence dans l'insuffisance rénale aiguë**
Julie Bellière (Toulouse)

Communication orale sélectionnée

- **SP11-1 - Caractérisation de la neuroinflammation et des modulations phénotypiques de la microglie au cours de la maladie de Parkinson par cytométrie en flux**
Morgane Prime (Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (INFINITY), INSERM UMR1291, CNRS UMR5051, Université Toulouse III, Toulouse, France)

16:15-17:45

SP12 - Forum Groupe 3C

Salle Argos - Niv. 1

Modérateurs : Samuel Granjeaud (Marseille) et Anne-Laure Iscache (Toulouse)

- **Vers l'automatisation de l'analyse post-clustering**
Eugénie Lohmann (Marseille)
- **Table ronde**

Communication orale sélectionnée

- **SP12-1 - Identification d'effets de lot et contrôle visuel de qualité d'échantillons de cytométrie par CytoMDS, un nouvel outil de visualisation en basses dimensions des distances entre échantillons 'single cell'**
Philippe Hauchamps (Biologie Computationnelle et Bio-informatique, Institut de Duve / UCLouvain, Bruxelles, Belgique)

17:45-19:00

P10 - Assemblée Générale AFC

Salle Ariane 1&2 - Niv. 1

19:30

Apéritif et dîner du congrès

Hôtel-Dieu Saint-Jacques

Salle des Colonnnes

- **Remise des Prix "Spécial Jeune Cytométriste"** Sponsorisé par  ALEXION
- **Remise des Prix "Meilleur poster"** Sponsorisé par  ambiotis

PROGRAMME - VENDREDI 17 NOVEMBRE

08:15-08:45 **Accueil des participants**Espace *Caravelle 1* - Niv. 0

SESSIONS PARALLÈLES

08:45-10:15

SP13 - High Content CytometrySalle *Ariane 1&2* - Niv. 1**Cytométrie de masse, spectrale et conventionnelle***Modérateurs* : Élodie Riant (Toulouse), Anne-Sophie Chrétien (Marseille) et Olivier Molendi-Coste (Lille)

- **The accumulation of NK cells with adhesion defects and limited cytotoxic functions is associated with a poor prognosis in Multiple Myeloma**
Ludovic Martinet (Toulouse)
- **Tertiary lymphoid structures are associated with enhanced macrophage and dendritic cell activation and proximity to CD8+ T cells, which better predict the clinical outcome of cervical cancer patients**
Laurent Gorvel (Marseille)

Communication orale sélectionnée

- **SP13-1 - 43 parameters for deep phenotyping of blood mononuclear cells, using specific features of spectral technology**
Sandrine Schmutz (Institut Pasteur, Paris, France)

08:45-10:15

SP14 - Microbiologie 2

Session commune avec la SFM

Salle *Argos* - Niv. 1**Autour des microbiotes***Modérateurs* : Delphine Lestrade (Toulouse) et Vincent Thomas (Paris)

- **Nouvelle approche de microfluidique basée sur l'utilisation de doubles émulsions, la cytométrie et la microscopie automatisée pour la métagénomique fonctionnelle et la culturomique**
Sophie Lajus (Toulouse)
- **Intérêt de la cytométrie en flux pour l'étude de l'interface immunitaire-fongique**
Alicia Moreno-Sabater (Paris)

Communications orales sélectionnées

- **SP14-1 - Détection et quantification de levures d'altération du vin (*Brettanomyces*) par une méthode couplant séparation immuno-magnétique et cytométrie**
David François (Amarok Biotechnologies, Saint-Malo, France)
- **SP14-2 - Analyse de la réponse immune systémique et mucosale anti-probiotiques**
Delphine Scalbert-Sterlin (Département d'Immunologie, La Pitié-Salpêtrière, Sorbonne Université, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France)

08:45-10:15

SP15 - Hématologie clinique 4Salle *Spot* - Niv. 1**Cytométrie clinique appliquée aux pathologies plaquettaires***Modérateurs* : Agnès Ribes (Toulouse) et Cédric Garcia (Toulouse)

- **La cytométrie en flux : une technique de routine pour le phénotypage des plaquettes sanguines en clinique**
Sonia Séverin (Toulouse)
- **Intérêts et application de la cytométrie en flux pour l'analyse des plaquettes et de la megacaryopoïèse**
Lucie Gelon (Toulouse)
- **Évaluation de différents paramètres d'activation des plaquettes et neutrophiles en cytométrie en flux classique et spectrale**
Anne-Claire Duchez (Saint-Étienne)

SESSION PLÉNIÈRE

10:15-11:00

P11 - Parole aux industriels

Salle Ariane 1&2 - Niv. 1

Analyses de données ou Panel design

Modératrices : Catherine Blanc (Paris) et Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive (Toulouse)

- **Beckman Coulter - Des données aux découvertes : Gestion et analyses des données avec la Plateforme Cytobank**
Antoine Fouillet (*Beckman Coulter*)
- **EasyPanel - Fully-Automated Panel Design Algorithm and Smart Antibody Stock Management System**
Omar Zid (*EasyPanel*)
- **Metafora - METAflow, your autopilot for navigating cytometry data : a solution combining familiarity with augmented intelligence for users to get quick, objective and reproducible results**
Vincent Petit (*METAFORA biosystems*)



11:00-11:45

Pause café - Visite de l'exposition

Espace Caravelle 1 - Niv. 0

SESSIONS PARALLÈLES

11:45-13:15

SP16 - High Content Imagerie

Salle Ariane 1&2 - Niv. 1

Imagerie et Imagerie en Flux

*Modératrices : Marie-Laure Renoud (Toulouse) et Catherine Blanc (Paris)*

- **Heterogeneity and spatial organisation of Tumour-Associated Mononuclear Phagocytes**
Charles Antoine Dutertre (*Paris*)
- **Spatial biology: How to choose the best approach?**
Aïda Meghraoui-Kheddar (*Nice*)

Communications orales sélectionnées

- **SP16-1 - Mapping of T cell subpopulations within the whole tissue organization by non-cyclic multiplex immunofluorescence imaging**
Léa Guyonnet (*Plateforme de cytométrie, Institut Curie, Paris, France*)
- **SP16-2 - Étude des effets bénéfiques de l'administration intranasale de probiotiques dans un modèle murin de pneumonie**
Patrice Hemon (*U1227, PF HYPERION, Brest, France*)

11:45-13:15

SP17 - Microbiologie 3

Session commune avec la SFM

Salle Argos - Niv. 1

Pathogènes

*Modérateurs : Lysiane Omhover (Illkirch) et Clément Trunet (Brest)*

- **Identification et évaluation d'anticorps monoclonaux anti-protéines de surface de *Clostridioides difficile***
Delphine Scalbert-Sterlin (*Paris*)
- **La cytométrie en flux au service de la recherche dans le domaine des procédés microbiologiques alimentaires : exploration physiologique de bactéries pathogènes exposées à des perturbations technologiques et présentent sur des matrices sèches**
Stéphane Guyot (*Dijon*)

Communications orales sélectionnées

- **SP17-1 - Évaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux : Perte de cultivabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur milieu gélosé suite à l'exposition à une émulsion huile dans eau**
Agath Dutoit (*LUBEM, Université Bretagne Occidentale, Quimper, France*)

... / ...

- **SP17-2 - *Listeria monocytogenes* en industrie agroalimentaire : l'impact des conditions environnementales sur son état physiologique et ses capacités de croissance**
Élodie Hoch (AERIAL, Illkirch Graffenstaden, France)
- **SP17-3 - Utilisation de la cytométrie en flux pour l'étude de mécanismes de résistance de *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme**
Jeanne Manaranche (Laboratoire de Chimie de Coordination - UPR 8241, CNRS, Toulouse, France)

11:45-13:15

SP18 - Hématologie clinique 5

Salle Spot - Niv. 1

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies plasmocytaires**Modérateurs :** Ludovic Martinet (Toulouse) et Nicolas Freynet (Paris)

- **Cibler le complexe polycomb PRC2 pour améliorer la réponse aux immunothérapies anti-CD38 dans le Myélome Multiple**
Jérôme Moreaux (Montpellier)
- **Analyses non supervisées pour le diagnostic et le suivi des gammopathies monoclonales**
Nicolas Freynet (Paris)

Communication orale sélectionnée

- **SP18-1 - Study of T cells in patients with multiple myeloma treated with CD3xBCMA bispecific antibody**
Yannick Simoni (Institut Cochin, Paris, France)



13:15-14:30

Déjeuner

Espace Caravelle 2 - Niv. 0

Clôture du 26^e congrès de l'Association Française de Cytométrie

26^e CONGRÈS ANNUEL DE L'ASSOCIATION FRANÇAISE DE CYTOMÉTRIE

15-17 novembre



CYTOMÉTRIE 2023



Centre de Congrès Pierre Baudis TOULOUSE

RÉSUMÉS DES COMMUNICATIONS

MERCREDI 15 NOVEMBRE



Designing high parameter panels

[O. Burton](mailto:ob240@cam.ac.uk) (ob240@cam.ac.uk)

Pathology, University of Cambridge, Cambridge, UK

Flow cytometry excels at delivering high throughput, precise data at considerably lower cost per cell than other single cell technologies. With advances in instrument and fluorophore technology, it is now possible to measure more than 40 antigens simultaneously, providing high dimensional data on millions of cells. The challenge lies in compiling a set of reagents that allows detection of 40+ markers while avoiding loss of resolution that comes from spectral overlap. In this talk I'll discuss some of the common issues that arise in designing and operating high parameter panels for flow cytometry, such as fluorophore choice, antibody testing, data spreading, distortion, unmixing and dealing with autofluorescence. I'll offer suggestions for best practices and approaches for designing around these problems.

Image Cytometry as a tool to deciphering single cell heterogeneity in health and disease

A. Filby (andrew.filby@ncl.ac.uk)

Flow Cytometry and Single Cell Technologies Platform, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, Royaume-Uni

Analysis of Imaging Mass Cytometry (IMC) data and other low-resolution multiplexed tissue imaging technologies is often confounded by poor single cell segmentation and sub-optimal approaches for data visualisation and exploration. This can lead to inaccurate identification of cell phenotypes, states or spatial relationships compared to reference data from single cell suspension technologies. To this end we have developed the 'OPTIMAL' framework to benchmark any approaches for cell segmentation, parameter transformation, batch effect correction, data visualisation/clustering and spatial neighbourhood analysis. Using a panel of 27 metal-tagged antibodies recognising well characterised phenotypic and functional markers to stain the same FFPE human tonsil sample Tissue Microarray (TMA) over 12 temporally distinct batches we tested several cell segmentation models, a range of different *arcsinh* cofactor parameter transformation values, five different dimensionality reduction algorithms and two clustering methods. Finally we assessed the optimal approach for performing neighbourhood analysis. We found that single cell segmentation was improved by the use of an Ilastik-derived probability map but that issues with poor segmentation were only really evident after clustering and cell type/state identification and not always evident when using 'classical' bi-variate data display techniques. The optimal *arcsinh* cofactor for parameter transformation was 1 as it maximised the statistical separation between negative and positive signal distributions and a simple Z-score normalisation step after *arcsinh* transformation eliminated batch effects. Of the five different dimensionality reduction approaches tested, PacMap gave the best data structure with FLOWSOM clustering out-performing Phenograph in terms of cell type identification. We also found that neighbourhood analysis was influenced by the method used for finding neighbouring cells with a 'disc' pixel expansion outperforming a 'bounding box' approach combined with the need for filtering objects based on size and image-edge location. Importantly OPTIMAL can be used to assess and integrate with any existing approach to IMC data analysis and, as it creates .FCS files from the segmentation output, allows for single cell exploration to be conducted using a wide variety of accessible software and algorithms familiar to conventional flow cytometrists. Professor Filby will also discuss the use of the OPTIMAL framework to analyse post-mortem lung tissue from COVID19 deaths.

Références :

1. Hunter et al, 2023, Cytometry Part A, <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24803>

A new method for the automated enumeration and analysis of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by flow cytometry

L. Barrientos¹ (lbarrientos@beckman.com), D. Faye², D. Rhodes², D. Flagler³, E. Flores Fuentes³, G. Cheng³, K. Lo³, A. Boehmler³

¹ R&D Life Science, Beckman Coulter, Marseille, France

² Beckman Coulter, Marseille, France

³ Beckman Coulter, Miami, États-Unis

Introduction and Objectives:

Clinical laboratories rely on commercially available IVD solutions for CD34+ cell enumeration in order to avoid time- and resource-consuming validation of user-defined tests. Most reagent kits and software packages used in flow cytometry were developed as a response to the 1996 and 1998 ISHAGE Guidelines but have not been updated since then to meet the growing demands of diagnostic laboratories, in terms of automation, data traceability, and the ability to adapt acquisition and analysis panels to evolving regulations and guidelines.

Methods:

We have developed an automated solution for CD34+ cell enumeration by flow cytometry, consisting of hardware, software, and reagents, that streamlines operations by incorporating automated sample loading, sample preparation, reagent management, and barcode scanning, as well as data analysis and bidirectional LIS connectivity in one compact device platform. Samples are just loaded on the system by the operator, and sample preparation and data analysis are performed automatically by the analyzer. The acquisition and analysis software follow the sequential gating strategy of the ISHAGE Guidelines and provide panel options that allow the running of tests in duplicate plus negative control, without the use of a negative control, or as a single test. Antibody and reagent vials include a unique barcode identity for tracking the expiration date, on-board expiration, manufacturing lot and container numbers, supporting Quality Management system data traceability requirements.

Results, Discussion & Conclusion:

Our newly developed system for CD34+ cell enumeration by flow cytometry provides a comprehensive solution for automated CD34+ cell enumeration that minimizes the need for human intervention, and potentially enables laboratories to offer CD34+ enumeration outside regulatory lab office hours. Both innovative aspects may increase the level of patient care and reduce time-to-result for this time-critical application.

Références :

1. Sutherland, D.R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R., Chin-Yee, I. 1996, J. Hematotherapy, 5, 213-226.
2. Keeney M, Brown W, Gratama J, Papa S, Lanza F, Sutherland DR. 2003, J Biol Regul Homeost Agents. 17:247-253.
3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2007. CLSI document H42-A2.

The Camelid-derived VHH-antibody JK36 overcomes epitope masking by therapeutic Anti-CD38 Antibodies

M. Burgaud¹ (mburgaud@beckman.com), C. Bodi², M. Kapinsky³, F. Monsonis¹, N. Dupas¹

¹ R&D Life Sciences, Beckman Coulter, Marseille, France

² Beckman Coulter, Marseille, France

³ Product management, Beckman Coulter, Krefeld, Germany

The high surface expression of the NAD⁺-metabolizing ectoenzyme CD38 is considered the phenotypic hallmark of plasma cells, which has propelled its intense investigation as a target for antibody-dependent cellular cytotoxicity. The resulting anti-CD38 antibodies that may elicit immune-mediated elimination of CD38-expressing cells (mostly through antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)), frequently show considerable epitope overlapping with commercially available monoclonal mouse anti-CD38 antibodies, limiting the study of surface CD38 expression at the single-cell level in the presence of ADCC-inducing conventional antibodies.

Nanobodies, derived from heavy-chain antibodies that naturally occur in llamas and other camelids, can circumvent these undesired interferences. Single variable domain antibody fragments (VHH) contain a long complementarity-determining region 3 (CDR3). This feature allows them to recognize hidden epitopes, e.g. in molecular cavities, that are inaccessible to the CDRs in conventional analytical and ADCC-inducing antibodies.

JK36 is an anti-CD38 recognizing a cryptic epitope not masked by anti-CD38 therapies, opening new avenues in multiple myeloma clinical research.

Here we show performance of two CD38 (JK36) conjugates, Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 700.

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

Easy-to-use functional NK cells assay and associated stimulation reagent

M. Burgaud¹ (mburgaud@beckman.com), H. Vellenriter¹, C. Bodi¹, M. Kapinsky², N. Dupas¹

¹ R&D Life Sciences, Beckman Coulter, Marseille, France

² Product management, Beckman Coulter, Krefeld, Germany

NK cells play important roles in innate defenses against viruses and in the control of tumor growth and metastasis. This anti-tumor effect is mediated by inflammatory cytokines production such as Interferon- γ (IFN γ) or Tumor Necrosis Factor (TNF α).

The NK cells' multi-effective functions provide several interesting clinical utilizations as cancer immunotherapeutic for the treatment of hematological malignancies. Consequently, biological tools are required for phenotypic and functional NK cell characterization. Moreover, the appearance of a new generation of allogeneic cellular therapies based on native or genetically modified NK cells (CAR-NK) creates a demand for single cell-resolved screening and characterization with a short turnaround time.

Here we present an easy-to-use functional NK cell antibody panel in DURA Innovations format with no need of antibody pipetting, instrument setup, compensation, and wash steps. This preconfigured dried antibody panel (DURAClone IF NK Activation) covers phenotypic NK cells with CD56 antibody conjugate, and the functionality markers IFN γ and TNF α .

In parallel, we present a new NK cell-specific stimulation reagent in DURA Innovations format (DURActive 4). It combines pro-inflammatory cytokines IL-12 and IL-18 to activate, by their synergy, the production of IFN γ and TNF α by NK cells. Brefeldin A is added to block Golgi-apparatus-mediated secretion. DURActive 4 is a ready-to-use positive control for functional NK cell assays, providing the ultimate level of simplicity in handling of sensitive biological compounds: no aliquoting, no freezing, no thawing, no dilution, and no pipetting of the stimulant mix.

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

New ready-to-use and automation-friendly solution for basic phenotyping of human whole blood and derived PBMC suspension

N. Dupas¹ (nathalie.dupas@beckman.com), S. Mazumder², G. EA², S. Saif², M. Kapinsky³

¹ R&D Life Sciences, Beckman Coulter, Marseille, France

² R&D Life Sciences, Beckman Coulter, Bangalore, India

³ Product management, Beckman Coulter, Krefeld, Germany

DURAClone IM phenotyping BASIC panel allows for identification of major lymphocyte and monocyte subpopulations with the following markers: CD45, CD16, CD56, CD19, CD14, CD3, CD4 and CD8. This panel is already available in the DURA innovations tube format.

To accommodate the need for flow cytometry solutions with elevated throughput in the pharmaceutical research and Contract Research Organization market segment, automation-friendly solutions are required. Direct processing of whole blood is also desirable because it saves time and precious materials and helps to avoid potential bias resulting from pre-analytical enrichment such as bulk pre-lysing or Ficoll-gradient centrifugation.

Here we present the first RUO ready-to-use DURAClone IM phenotyping BASIC panel at 96 shallow well plate DURA innovations format that allows for highly efficient manual or automated sample preparation for basic phenotyping of human whole blood samples and derived PBMC suspension. Compatibility of whole blood samples in 96 shallow well plates is possible thanks to FLEXLyse, a lysing solution with a low volume ratio of Lysis/whole blood applicable in wash and no-wash modes.

Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

Establishment of a standardized multi-site Cytometry - single cell omics - NGS pipeline at the Institut Curie

C. Lasgi^{1,2} (charlene.lasgi@curie.fr), M. Dubail³, M. Bohec^{2,4}, A. Chipont^{1,2}, L. Guyonnet^{1,2}, A.-G. Lafont^{1,2}, A. Viguié^{1,2}, L. De Koning², A. Londono³, S. Baulande^{2,4}, C. Fouillade³, C. Guérin^{1,2}

¹ Cytometry (CYTPIC) Platform, Research Center, Institut Curie, Paris-Orsay, France

² Single Cell Initiative, Research Center, Institut Curie, Paris, France

³ Inserm U1021-CNRS UMR 3347, University Paris-Saclay, Institut Curie, Orsay, France

⁴ Genomics of Excellence (ICGex) Platform, Research Center, Institut Curie, Paris, France

The Institut Curie research center is spread over 3 sites located in Paris, Orsay and St Cloud. Some platforms, as the Cytometry Platform (CYTPIC), are multi-site while others, as the Next Generation Sequencing (NGS-ICGex) platform, are mono-site. The institutional «Single Cell Initiative» bringing together four platforms of the Institute (Cytometry, Custom Single Cell Omics platform, Next Generation Sequencing and Bioinformatics) is a structuring program aiming to coordinate and share resources to optimize the services and developments of Single Cell technologies for the scientific community. To compensate for the distance between sites, give access to certain resources and provide a straightforward pipeline for Single Cell Analysis while meeting the growing needs of research teams at the Orsay site, a 10X Genomics «Chromium Controller» single cell partitioning/barcoding technology has been implemented within the Cytometry Platform in Orsay site in very close collaboration with the Next Generation Sequencing Platform from Paris. A synchronized and standardized pipeline between Cytometry and NGS-ICGex platforms was therefore established to maximize the sample integrity and quality: Sample preparation, cell sorting and barcoding on fresh samples are done in Orsay, transportation of DNA samples is ensured by internal shuttle from Orsay to Paris and NGS is performed in Paris. Both platforms agree on a per experiment basis regarding the choice of barcoding indexes to ensure compatibility of subsequent sequencing. This optimized approach enabling an innovative service in Orsay open new application as in a research project on the development of acute and delayed radiotoxicity in the lung which aim to compare transcriptome profiles on a Ki67-GFP+ transgenic mouse model between the two types of irradiation, the conventional one or the FLASH one, shown to spare cycling cells.

After two years in service, a robust, efficient, optimized and synchronized pipeline between the Paris and Orsay sites has been established in close collaboration between Cytometry and Next Generation Sequencing platforms. Projects initiated on the Orsay site before the creation of this pipeline have been push forward, and new teams have been strengthened to start single-cell omics projects.

The cytometry platform CYTPIC, having acquired new skills, plans to duplicate this know-how at the new Institut Curie's St-Cloud site in the coming year.

Identification et séparation de deux populations de macro-parasites par cytométrie en flux

A. Sausset¹ (alix.sausset@inrae.fr), F. Guégnard², D. Serreau², C. Neveu², C. Schouler³, Y. Le Vern¹

¹ UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique / Équipe IMI, INRAE, Nouzilly, France

² UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique / Équipe CREM, INRAE, Nouzilly, France

³ UMR1282 Infectiologie et Santé Publique / Équipe MIMOSA, INRAE, Nouzilly, France

Introduction et Objectifs :

Les parasites *Ascaridia galli* et *Heterakis gallinarum* sont des parasites intestinaux appartenant à la famille des nématodes. Ils infectent les volailles mais présentent une pathogénicité différente. Les œufs de ces parasites sont retrouvés dans les fientes des animaux infestés et peuvent engendrer des co-infestations d'animaux. Ils ont des morphologies proches avec une légère différence de taille (75/80 x 45/50 µm pour *A. galli* et 63/75 x 36/50 µm pour *H. gallinarum*). Bien que les vers vivent à des endroits différents du tractus digestif (jejunum pour *A. galli* / caeca pour *H. gallinarum*), les œufs émis par les vers femelles de chaque espèce se retrouvent mélangés dans les fientes. De plus, seuls les œufs embryonnés sont infestants pour la volaille. Il est donc nécessaire de trouver un moyen d'identifier et de séparer ces populations parasitaires quasi-similaires morphologiquement par cytométrie en flux afin de pouvoir les étudier et les caractériser individuellement (infections expérimentales, biologie moléculaire...).

Matériel et Méthodes :

Les expériences ont été réalisées à partir d'échantillons contenant une population parasitaire pure obtenue après séparation des vers adultes lors d'autopsies de poulets co-infestés, maintien des vers vivants *ex vivo* et récupération des œufs émis. Un mélange des 2 populations parasitaires : œufs d'*A. galli* et œufs d'*H. gallinarum* a ensuite été effectué. Dans le but d'infester expérimentalement des poulets, un tri d'œufs embryonnés d'*A. galli* a également été réalisé sur une population contenant des éléments parasitaires embryonnés et non-embryonnés.

La différenciation et le tri par cytométrie en flux de ces populations parasitaires ont été réalisés grâce à un trieur de cellules MoFlo Astrios (BeckmanCoulter). La taille de la buse, les paramètres de pression et l'ensemble des réglages de tri ont été adaptés pour trier ces parasites de grande taille. Il a été ainsi possible de séparer sans marqueur fluorescent les différentes populations de macroparasites et de récupérer ces œufs de parasites en microplaques.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Les œufs d'*A. galli* et d'*H. gallinarum* sont très proches morphologiquement et donc particulièrement complexes à différencier. Les œufs embryonnés et non-embryonnés d'*A. galli* sont également quasi-similaires morphologiquement. Cette étude représentait ainsi un défi technique lié à la grande taille des parasites, à l'absence de marquage spécifique et au manque de données pour utiliser la buse de 200 µm sur le MoFlo Astrios EQ (BeckmanCoulter). L'adaptation de l'ensemble des réglages et des paramètres de pilotage et de seuillage a été nécessaire. Pour différencier les 2 populations parasitaires, l'association d'une combinaison de paramètres (de morphologie et d'autofluorescences) a été utilisée et plus particulièrement une combinaison des paramètres d'autofluorescence bleue après une excitation à l'aide du laser violet et d'autofluorescence verte après une excitation à l'aide du laser bleu. Des tris cellulaires de différentes quantités d'œufs de parasites par puits en microplaques de 96 et 384 ont été réalisés pour ensuite être inoculés à des poulets. L'étude ultérieure consistait à faire des essais sur les modalités d'infestations de poulets en vue d'une évaluation future de l'effet d'extraits de macro-algues lors des infestations parasitaires (Labcom Algahealth).

Références :

1. Kerboeuf D, Guégnard F, Vern YL. (2003) Detection of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance against anthelmintics in *Haemonchus contortus* using anti-human mdr1 monoclonal antibodies. *Parasitol Res.* ;91(1):79-85.
2. Kerboeuf D, Guégnard F, Le Vern Y. (2002) Analysis and partial reversal of multidrug resistance to anthelmintics due to P-glycoprotein in *Haemonchus contortus* eggs using *Lens culinaris* lectin. *Parasitol Res.*;88(9):816-21.
3. Riou M, Guégnard F, Sizaret PY, Le Vern Y, Kerboeuf D. Drug (2010) resistance is affected by colocalization of P-glycoproteins in raft-like structures unexpected in eggshells of the nematode *Haemonchus contortus*. *Biochem Cell Biol.* ;88(3):459-67.

Suivi en cytométrie en flux des patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 pour lymphome cérébral : Marqueurs et dynamiques de réponse et de toxicité

J. Al Samara¹ (jules.alsamara@aphp.fr), M. Gazzano¹, C. Parizot¹, A. Guihot¹, M. Baron², S. Choquet², G. Gorochov^{1,3}, D. Sterlin^{1,3}

¹ Département d'immunologie, AP-HP, Paris, France

² Service d'hématologie clinique, AP-HP, Paris, France

³ Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Sorbonne Université, Inserm, Paris, France

Introduction et Objectifs :

L'immunothérapie par cellules T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T) a révolutionné la prise en charge de patients atteints d'hémopathies malignes. Compte tenu de la toxicité neurologique qu'ils risquent, les patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B de localisation cérébrale primitive ou secondaire constituent une population singulière. Nous présentons ici les résultats obtenus sur une cohorte, unique de par sa taille, de patients atteints de lymphome cérébral traités par cellules CAR-T de type axicabtagen ciloleucel (axi-cel) ou tisagenlecleucel (tisa-cel).

Matériels et Méthodes :

Plusieurs techniques de cytométrie en flux (CMF) ont été employées. Avant réinjection, les cellules obtenues par un lavage de la poche du produit ont été marquées par un mélange d'anticorps permettant la définition de la population CAR-T, ses sous-types CD4+ et CD8+ et d'étudier l'expression des marqueurs d'épuisement cellulaire TIM-3, CTLA-4 et PD-1. L'acquisition des cellules a été effectuée par un cytomètre de type Navios EX®. Une version simplifiée de ce protocole a permis le suivi des populations CAR-T dans le sang à intervalle régulier après réinjection. En outre, nous avons utilisé un système fermé de type Aquios® afin de permettre un suivi quantitatif précis des populations T CD4+, CD8+, NK et B.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Trente patients ont été inclus dans notre étude. Nos résultats ont d'abord mis en évidence une hétérogénéité dans la composition des poches de perfusion de cellules CAR-T. Après la réinjection, un pic d'expansion est atteint aux alentours du 7ème jour. Le nombre de cellules CAR-T circulantes, ainsi que des cellules CAR-T CD8+, au moment du pic ont été supérieurs chez les patients ayant présenté une réponse après un mois du traitement. En effet, cette expansion des cellules CAR-T entre la poche et le pic semble être guidée chez les patients répondeurs par une expansion de la population CAR-T CD8+. De plus, une meilleure survie a été observée chez les patients ayant présenté une forte expansion de cette population CAR-T CD8+, soulignant l'importance de cette dynamique précoce dans les réponses à long terme. Ces résultats viennent appuyer les rapports ayant déjà associé l'efficacité de cette thérapie à l'expansion des cellules CAR-T CD8+ de type central-mémoire^{1,2}. En revanche, chez les patients ayant développé un syndrome de neurotoxicité associée au traitement par cellules CAR-T (ICANS), l'expression des marqueurs d'épuisement sur les cellules CAR-T de la poche ainsi que la dynamique d'expansion des cellules CAR-T CD8+ ont indiqué un phénomène d'épuisement. D'un autre côté, comme il a été récemment décrit³, les cellules CAR-T CD4+ semblent jouer un rôle prépondérant dans l'induction du syndrome de relargage cytokinique (CRS). Cette population a été présente en plus grand nombre au 4ème jour dans la circulation des patients ayant présenté un CRS.

En conclusion, la cytométrie en flux a permis de révéler différentes caractéristiques intrinsèques des cellules CAR-T en lien avec l'efficacité et les toxicités de cette thérapie.

Références :

1. Deng Q, Han G, Puebla-Osorio N, et al. Characteristics of anti-CD19 CAR T cell infusion products associated with efficacy and toxicity in patients with large B cell lymphomas. *Nat Med* 2020;26(12):1878–1887.
2. Haradhvala NJ, Leick MB, Maurer K, et al. Distinct cellular dynamics associated with response to CAR-T therapy for refractory B cell lymphoma. *Nat Med* 2022;28(9):1848–1859.
3. Boulch M, Cazaux M, Cuffel A, et al. A major role for CD4+ T cells in driving cytokine release syndrome during CAR T cell therapy. *Cell Rep Med* 2023;101161.

Défaut d'activation conformationnelle de l'intégrine LFA-1 dans les lymphocytes CAR-T thérapeutiques

C. Bouisset¹ (clement.bouisset@inserm.fr), H. Daniels^{1,2}, L. Dupré^{1,3}

¹ Équipe 12 - R. Lesourne - L. Dupré, Infinity, Toulouse, France

² ENVT, Toulouse, France

³ Department of Dermatology, Medical University of Vienna, Vienne, Autriche

Introduction et Objectifs :

L'immunothérapie basée sur l'utilisation de lymphocytes T modifiés *ex-vivo* pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR-T) est un nouveau volet extrêmement prometteur de la lutte anticancéreuse. Néanmoins, cette thérapie nécessite d'être optimisée afin de lever certaines barrières limitant leur efficacité. L'adhérence restreinte des CAR-T à leur cible tumorale ainsi que leur incapacité à assembler une synapse immunologique optimale apparaissent comme des facteurs réduisant leur activité cytotoxique et leur persistance *in vivo*. Dans ce contexte, l'intégrine LFA-1, qui joue un rôle crucial dans l'adhérence et la formation de la synapse immunologique, est un acteur moléculaire central à explorer chez les cellules CAR-T. Ainsi, notre projet vise à mieux comprendre le fonctionnement des CAR-T au travers de la mobilisation de LFA-1 et des réponses médiées par cette intégrine.

Matériels et Méthodes :

Pour mieux comprendre le rôle de LFA-1 dans les CAR-T, nous avons mis en place une stratégie originale d'analyse combinant de la cytométrie en flux et de l'imagerie cellulaire à haut-débit. Ces deux approches complémentaires nous permettent d'obtenir une vision précise et intégrée de l'adhérence, de l'activation de LFA-1, de l'assemblage de la synapse et de la cytotoxicité des CAR-T. Nous avons comparé l'activation de LFA-1 suite à l'engagement du récepteur chimérique CAR par rapport au récepteur antigénique natif (TCR), grâce à un anticorps révélant spécifiquement la conformation active de l'intégrine. En parallèle, nous avons comparé la capacité des CAR-T à exocytoser leur granules lytiques *via* un marquage de surface de la protéine LAMP1, contenue dans ces granules.

Résultats, Discussion et Conclusion :

L'approche par cytométrie en flux nous a permis d'établir une relation étroite entre l'activation de LFA-1 et la libération des granules lytiques, dans le contexte d'une titration de la stimulation du TCR. En outre, l'ajout d'un inhibiteur conformationnel de LFA-1 (BIRT377) abroge la dégranulation indiquant donc que la forme activée de LFA-1 conditionne la dégranulation. Dans le contexte de l'engagement du CAR, les taux d'activation de LFA-1 et de dégranulation sont réduits suggérant qu'une activation conformationnelle sous-optimale de LFA-1 pourrait restreindre la capacité des CAR-T à libérer le contenu de leurs granules lytiques. L'approche quantitative d'imagerie cellulaire à haut débit nous a permis de confirmer ces résultats mais aussi de démontrer que, contrairement à la stimulation du TCR, l'engagement du CAR ne permet pas l'assemblage correct « en anneau » de LFA-1 activé, ni la formation de synapses adhésives.

Ainsi en combinant des approches complémentaires de cytométrie en flux et d'imagerie cellulaire à haut débit nous avons révélé que les CAR-T échouent à activer pleinement le changement de conformation de LFA-1, conduisant à la mise en place de synapses désorganisées, moins adhésives et moins productives, comme en témoigne le défaut de dégranulation de ces cellules.

Au vu de ces résultats, renforcer les propriétés adhésives des cellules CAR-T, par exemple *via* la modulation de protéines impliquées dans l'activation de LFA-1, se dégage comme une stratégie d'optimisation des CAR-T.

Un grand nombre de paramètres implique de grandes responsabilités : comment passer du conventionnel au spectral avec succès en plateforme ?

H. Garnier (hugo.garnier@inserm.fr), A.-L. Iscache, V. Duplan-Eche, F.-E. L'Faqih-Olive

Plateau de Cytométrie et Tri Cellulaire, INFINITY, Toulouse, France

Les avancées technologiques de la cytométrie en flux et une meilleure compréhension de la complexité du système immunitaire ont conduit au développement de panels d'anticorps de plus en plus larges. Pour répondre aux besoins des projets des utilisateurs de notre plateforme, nous avons mis en place une démarche collective de développement de panels multicolore optimisés sur un cytomètre multiparamétrique conventionnel (Symphony A5 BD). Cette démarche structurante et mutualisée, présentée à l'AFC 2021 à Strasbourg, nous a permis de concevoir, tester et valider nos panels. Nous avons ainsi mis en place 2 panels lymphoïdes humain et murin de 30 paramètres pour caractériser les différentes sous populations du système immunitaire. Ces panels « clefs en mains », standardisés du protocole de marquage à l'acquisition jusqu'au retraitement des données, sont disponibles pour les chercheur.es de l'institut ainsi que pour l'ensemble de la communauté scientifique Biosanté en Occitanie.

La rupture technologique de la cytométrie spectrale, qui contrairement à la cytométrie conventionnelle distingue le spectre d'émission complet de chaque fluorochrome plutôt que d'analyser uniquement le maximum du pic d'émission, permet un saut technologique en augmentant le nombre de paramètres pour caractériser finement des populations cellulaires d'intérêt. Dans l'objectif d'une part, de transposer facilement nos panels optimisés en cytométrie conventionnelle sur un cytomètre spectral et d'autre part augmenter le nombre de paramètres d'analyse, nous décrivons dans ce travail une approche méthodologique en plateforme pour passer de la technologie conventionnelle à la cytométrie spectrale de façon efficace.

Pour comparer les deux technologies nous avons testé notre panel lymphoïde humain 28 couleurs. Pour cela, nous avons utilisé des cellules mononuclées du sang périphérique humain congelées et notre protocole de marquage optimisé pour de la cytométrie conventionnelle. Les échantillons ont été acquis le même jour sur un cytomètre Symphony 5 lasers et un cytomètre spectral Aurora 5 Lasers (Cytek). Pour comparer la sensibilité des deux technologies, nous avons calculé les stain index (SI) puis nous avons comparé les fréquences et la résolution des populations cellulaires.

Nos résultats montrent que les SI avec la cytométrie conventionnelle sont équivalents à ceux obtenus avec la cytométrie spectrale. La caractérisation des populations immunes en terme de fréquence est semblable entre les deux technologies. En revanche, la résolution de certaines populations est meilleure avec la technologie spectrale, en particulier pour les sous populations de cellules plus rares. Notre panel optimisé sur un cytomètre conventionnel est totalement et facilement transposable sur un cytomètre spectral.

En conclusion, pour des panels multicolore jusqu'à 30 paramètres, le passage de la technologie conventionnelle à la technologie spectrale en plateforme peut donc se faire de façon efficace si les panels ont été préalablement optimisés : standardisation du protocole de marquage, titrages des anticorps et choix des bons contrôles.

50 nuances de Fluo pour suivre la réponse immunitaire

D. Popoff (popoff@ciml.univ-mrs.fr), C. Mionnet

CIML, Marseille, France

Introduction et Objectifs :

La coqueluche, maladie pulmonaire causée par *Bordetella pertussis* (*B.p*), continue d'être une maladie endémique au niveau mondiale avec plus de 40 000 000 de cas par an. *Bordetella pertussis* est l'unique membre de la famille des bordetelles à produire la toxine pertussique (PTX) ce qui en fait un antigène majeur de la réponse immunitaire naturelle ou induite par un vaccin contre ce pathogène. La PTX est connue pour impacter l'ensemble des étapes de la réponse immunitaire. Par exemple, elle inhibe la migration des cellules dendritiques du site de l'infection vers le ganglion drainant. Notre objectif est donc de déterminer si la PTX en influant sur la réponse immunitaire locale et systémique impacte la mise en place d'une réponse mémoire protectrice à plus long terme. Pour cela, en utilisant la cytométrie spectrale nous avons éprouvé un panel contenant 48 marqueurs nous permettant de suivre chez souris la majorité des populations immunitaires dans les poumons, le sang, les ganglions et la rate.

Matériels et Méthodes :

Notre étude cinétique se fait sur des souris C57/Bl6 infectées par une souche de *Bordetella pertussis* exprimant (WT) ou non la PTX (DPTX). Les souris sont sacrifiées à 2, 5, 9 et jours post infection. De plus, afin de distinguer les populations résidentes des populations circulantes, les souris sont injectées par voie intra-veineuse 5 min avant leur sacrifice avec un anti corps anti CD45 fluorescent. Le marquage, avec nos 48 marqueurs, des cellules isolées des différents organes d'intérêts, par digestion enzymatique ou traitement mécanique, se fait dans un tampon développé au cours de ce travail à 37°C et en plusieurs étapes.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Dans nos travaux précédents, en utilisant ce modèle et un panel 28 marqueurs, nous avons déterminés que la PTX était nécessaire à l'apparition, à 15 jours post infection, d'une population de lymphocytes T mémoire résidentes du tissu (TRM). Leurs présences est confirmées avec ce panel 48 marqueurs. De plus, l'étude longitudinale de la réponse à l'infection, et l'aide de ce nouveau panel nous a permis d'identifier une population de lymphocytes T, exprimant 2 marqueurs spécifiques, apparaissant avant l'induction des TRM, et uniquement dans les ganglions médiastinaux (drainant le poumon) et le sang des souris infectées par la souche WT. Ces résultats semblent indiquer que nous avons identifié les précurseurs des TRM et travaillons à démontrer cette hypothèse.

En conclusion, dans le cadre d'une infection à *Bordetella pertussis*, l'impact de la PTX sur la réponse immunitaire (recrutement de neutrophiles, monocytes et des éosinophiles), mène à l'apparition d'une population de cellules précurseurs qui en réponse à des signaux locaux finira de se différencier en TRM.

Détermination du rôle fonctionnel et de la localisation pulmonaire des sous-populations de cellules T CD8⁺ effectrices et mémoires conventionnelles pendant l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*

M. Caouaille (maxime.caouaille@ipbs.fr), M. Faucher, E. Näser, O. Neyrolles, D. Hudrisier

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Toulouse, France

Introduction et Objectifs :

Comprendre les mécanismes de la protection immunologique contre la tuberculose revêt un enjeu fondamental et appliqué. Si l'action des cellules T CD4⁺ est fortement documentée et indéniable, il apparaît que cela ne permet pas de fournir les outils prédictifs, diagnostiques et vaccinaux permettant de lutter efficacement contre cette pathologie d'importance planétaire et pointe sur la nécessité d'évaluer d'autres réponses immunologiques. Sur la base d'études publiées chez l'homme et les modèles animaux de tuberculose et de leur potentiel en vaccinologie, il apparaît clairement que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8⁺ sont une cible d'intérêt dans ce contexte. Un angle non évalué toutefois est de comprendre quels sont les rôles – protecteurs, neutres ou destructeurs – des différentes sous populations de ces cellules. L'objectif principal de ce projet consiste donc à caractériser qualitativement et quantitativement ces sous-populations de cellules dans des modèles murins appropriés de tuberculose.

Matériels et Méthodes :

Nous avons développé un panel de 26 anticorps pour une analyse en cytométrie spectrale de ces différentes populations de cellules présentes dans les poumons de souris au cours de l'infection. Ce panel permet de dénombrer et de connaître la localisation parenchymateuse ou intravasculaire des différentes populations naïves, effectrices et mémoires de lymphocytes T CD8⁺ définies phénotypiquement et fonctionnellement. Nous pouvons également déterminer ces paramètres sur les T CD8⁺ spécifiques de l'antigène immunodominant de *M. tuberculosis* chez la souris, à l'aide d'un tétramère de complexe antigène-CMH.

Cette analyse est réalisée à différents temps sur des souris C57Bl/6 femelles de 6 à 8 semaines infectées par *M. tuberculosis*. L'acquisition des échantillons est réalisée sur le cytomètre Cytex

Northern Lights et les analyses par gating manuel et par des approches non biaisées sont faites sur FlowJo.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Les résultats préliminaires nous ont permis d'identifier par des approches non-supervisées 9 sous-populations mémoires et effectrices de cellules T CD8⁺, qui, en ce qui concerne les cellules parenchymateuses et spécifiques de *M. tuberculosis* incluent essentiellement des lymphocytes T résidents mémoires (T_{RM}), des T effecteurs mémoires (T_{EM}) des cellules T activées (SLEC) et à un degré moindre, des lymphocytes T stem cell memory (T_{SCM}). Sur la base de leur infiltration progressive et massive dans les poumons, de leur localisation purement parenchymateuse et de leur rôle crucial démontré dans d'autres infections, nous développons maintenant un intérêt particulier pour les T_{RM}. Nous recherchons actuellement comment cette diversité est représentée dans un modèle de souris hautement sensible à la tuberculose (souris SP140^{-/-}) et sur la base des résultats nous évaluerons le rôle protecteur des sous-populations principales de T CD8⁺ soit par transfert adoptif soit par déplétion sélective *in vivo*.

L'identification des sous-populations principalement associées à la protection offrira de nouvelles opportunités, à son traitement ainsi qu'à des stratégies vaccinales visant à activer ces populations.

Application de la loi d'Arrhénius pour la détermination d'une date limite d'utilisation de réactifs de cytométrie

D. François (contact@amarokbiotech.com), L. Chaillet, V. Genty

Amarok Biotechnologies, Saint-Malo, France

Introduction et Objectifs :

Chaque nouvelle méthode de diagnostic *in vitro* doit systématiquement être validée avant sa commercialisation, ce qui inclue notamment la détermination d'une date limite d'utilisation.

Lorsque les réactifs sont stables durant une longue période, de plusieurs mois à plusieurs années, la réalisation d'une étude de stabilité en temps réel n'est pas toujours envisageable. De plus, il s'agit de mesurer des paramètres physiologiques et non chimiques, dont l'interprétation est parfois plus complexe.

Matériels et Méthodes :

La méthodologie suivie durant cette étude est basée sur l'application de la loi d'Arrhénius, qui établit un lien entre la température et la vitesse d'une réaction chimique ; dans le cas présent, la dégradation des réactifs.

Le principe consiste à incuber les réactifs à des températures supérieures à leur température de conservation afin d'accélérer leur vieillissement de manière contrôlée. L'équation d'Arrhenius est ensuite appliquée pour déterminer par extrapolation la durée au bout de laquelle les réactifs ne répondent plus aux critères de qualité.

Cette méthodologie a été appliquée sur un kit de diagnostic *in vitro* destiné à quantifier les microorganismes par cytométrie en flux. Le principe de détection du kit repose sur la différence de perméabilité membranaire entre les cellules vivantes et les cellules mortes en appliquant un double marquage par deux fluorochromes. Ce sont ces fluorochromes qui ont fait l'objet d'une étude de stabilité accélérée.

La combinaison de microbiologie, de cytométrie en flux et l'utilisation de fluorochromes imposait plusieurs contraintes techniques et analytiques :

- La nécessité de préparer des échantillons microbiologiques stables dans le temps ;
- Le besoin d'identifier un paramètre quantitatif représentant l'état de vieillissement des fluorochromes ;
- La présence d'un phénomène de transfert de fluorescence entre les deux fluorochromes, qui accélère la perte de signal fluorescent une fois mélangés ;
- La perméabilité membranaire qui diffère entre les microorganismes, ce qui cause une réponse variable des deux fluorochromes au cours de leur vieillissement.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Les résultats qui seront présentés concernent principalement les solutions apportées aux différentes contraintes techniques. Cela concerne la préparation de cultures congelées et la méthode de revivification, le design du plan expérimental ainsi que l'application de la loi d'Arrhénius à partir de données de cytométrie.

Intérêt de l'exploration du profil d'expression du CD38 associé au score d'Ogata-R dans le diagnostic d'un syndrome myélodysplasique

S. Lecolant¹ (solene.lecolant@aphp.fr), P. Rameau², V. Saada¹

¹ Hématologie Biologique, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

² Plate-forme d'imagerie et cytométrie, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Introduction et Objectifs :

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des hémopathies malignes hétérogènes affectant préférentiellement les sujets âgés, correspondant à une atteinte clonale d'une (ou plusieurs) cellule(s) souche(s)/progénitrice(s) myéloïde(s). Elles se caractérisent par des cytopénies, parfois un excès de blastes, des anomalies morphologiques (dysplasie) affectant une ou plusieurs lignées myéloïdes et sont dominées par un risque d'évolution vers la leucémie aiguë myéloïde.

Le diagnostic repose sur plusieurs éléments, mais en premier lieu sur l'observation cytologique de signes de dysplasie. Toutefois, l'analyse morphologique nécessite une expertise et est sujette à des variations d'appréciation inter-observateurs *a fortiori* dans les SMD de bas grade. La présence de dysplasie souffre également d'un défaut de spécificité et peut être observée dans certaines conditions non malignes. C'est pourquoi diverses analyses de cytométrie ont été proposées afin d'objectiver la dysplasie en particulier le score d'Ogata révisé (Ogata-R).

Nous avons cherché à établir si ce score, qui repose sur 6 paramètres, pouvait être optimisé par l'étude de l'expression du CD38 sur les myéloblastes.

Matériels et Méthodes :

Au laboratoire d'Hématologie de l'Institut Gustave Roussy, nous avons analysé prospectivement, entre Octobre 2021 et Août 2023, les prélèvements médullaires de 82 patients. Tous les prélèvements ont fait l'objet d'une analyse cytologique, associée à l'établissement d'un score d'Ogata-R. Depuis Octobre 2021, nous avons intégré l'anticorps anti-CD38 couplé au FITC dans le panel dédié à cette analyse.

Pour la grande majorité des patients, un caryotype médullaire, ainsi qu'une analyse NGS myéloïde sur moelle et/ou sang ont également été réalisés. Tous les dossiers ont été discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire, pour établir (ou récuser) le diagnostic final de SMD.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Le score d'Ogata-R révisé a été réalisé sur les prélèvements médullaires de 82 patients. Parmi eux, un diagnostic de SMD a été retenu chez 27 (32,9 %), tandis que pour 55 patients (67,1 %) ce diagnostic a été éliminé.

Le score Ogata-R était positif chez 28 (34,1%) et négatif chez 54 patients (65,9%). Parmi les 28 patients avec score d'Ogata-R positif, 10 (35,7%) avaient été considérés comme non affectés par un SMD, alors que le diagnostic de SMD avait été retenu pour 9 (16,7%) des 54 patients avec un score d'Ogata-R non augmenté.

Le niveau d'expression du CD38 des myéloblastes (Mb) (normalisé sur la MFI du CD38 des granuleux CD10-) a été retrouvé significativement plus faible chez les patients avec diagnostic établi de SMD ($p < 0,0001$). Parmi ceux dont le score d'Ogata-R n'était pas augmenté alors que le diagnostic de SMD avait été retenu, les myéloblastes expriment plus faiblement le CD38 que chez les patients avec statut non SMD ($p = 0,0003$). De même, chez les patients dont le score d'Ogata-R était élevé alors que le diagnostic de SMD avait été récuser, les myéloblastes expriment plus fortement le CD38 que chez les patients avec SMD avéré ($p = 0,044$).

Nos données suggèrent que l'intégration de ce paramètre pourrait optimiser la sensibilité et spécificité du score d'Ogata-R, et devront être confirmées sur une série plus large de patients.

Références :

1. Mathis et al. 2015; Haematologica, 4 : 472-78.
2. Goardon et al. 2009; Haematologica, 94 : 1160-63.

La répression génique dépendante de l'hétérochromatine contrôle la réponse des cellules T CD4 à l'immunosuppression médiée par les Treg

J. Noguero^{1, 2} (julie.noguero@inserm.fr), K. Laviolette¹, M. Zahm¹, A. Chaubet¹, V. Adoue¹, C. Détraves¹, J. van Meerwijk^{1, 2}, O. Joffre^{1, 2}

¹ Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires, Toulouse, France

² Université Toulouse III, Toulouse, France

Introduction et Objectif :

L'intégrité de l'organisme dépend d'interactions étroites et dynamiques entre les lymphocytes T conventionnels (Tconv) et régulateurs (Treg). Les signaux extracellulaires et les cascades de signalisation qui régulent ces échanges ont été très largement caractérisés. Cependant, la manière dont les Tconv traduisent les signaux immunosuppresseurs au niveau de la chromatine reste largement méconnue. Nous avons établi, avec d'autres, un rôle central pour les voies épigénétiques dépendantes de la marque H3K9me3 dans la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules effectrices Th1 et Th2. Nous avons donc récemment émis l'hypothèse que les signaux immunosuppresseurs délivrés par les Treg pourraient, comme les signaux environnementaux qui définissent l'identité des cellules T helper, mobiliser ces mécanismes chromatinien pour reprogrammer et réguler fonctionnellement les Tconv.

Matériels et Méthodes :

En utilisant un modèle d'allogreffe de moelle osseuse, dans lequel le rejet du greffon est coordonné par des Tconv et peut être inhibé par des Treg, nous avons évalué le rôle de *chromatin writers* et *readers* de la marque H3K9me3 dans la reprogrammation des Tconv par les Treg. Après avoir analysé le phénotype des Tconv par cytométrie en flux, l'utilisation d'approches telles que le RNA-Seq et l'ATAC-Seq sur cellules allospécifiques triées par FACS nous a permis d'identifier les réseaux de gènes et les éléments génomiques contrôlés par ces protéines chromatinien en réponse aux signaux immunosuppresseurs.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Nous avons identifié deux voies épigénétiques dépendantes de la marque H3K9me3 mais moléculairement différentes avec des rôles opposés dans la réponse des Tconv à la suppression des Treg. En effet, alors que l'une d'entre elles augmente la susceptibilité des Tconv aux mécanismes de suppression, l'autre libère les cellules effectrices alloréactives de la répression dépendante des Treg. D'un point de vue mécanistique, nous montrons que la première voie est mobilisée en réponse aux signaux immunosuppresseurs pour verrouiller les gènes effecteurs des Tconv. A l'inverse, la deuxième voie agit comme un régulateur négatif des réseaux de gènes associés à l'anergie et à l'exhaustion des cellules T, dont notamment ceux codant pour les récepteurs inhibiteurs PD-1, LAG-3 et TIM-3. Nos données démontrent ainsi que les voies épigénétiques dépendantes de H3K9me3 régulent de manière critique la susceptibilité des Tconv à la suppression médiée par les Treg. Nous avons donc identifié de nouveaux acteurs épigénétiques qui pourraient être manipulés pour corriger des immunopathologies ou pour restaurer des réponses immunitaires protectrices.

Integrating mass cytometry in reliable multi-omic predictive modeling studies

J. Hédou¹ (hedoujrr@gmail.com), J. Einhaus^{1,2}, I. Maric¹, G. Bellan³, B. Gaudillière¹

¹ Stanford University School of Medicine, Stanford, États-Unis

² University Hospital and Comprehensive Cancer Center Tübingen, Tübingen, Allemagne

³ Télécom Paris, Paris, France

Adoption of high-content omic technologies in clinical studies, coupled with computational methods, have yielded an abundance of candidate biomarkers. However, translating such findings into bona fide clinical biomarkers remains challenging. To facilitate this process, we introduce Stabl, a general machine learning method that identifies a sparse, reliable set of biomarkers by integrating noise injection and a data-driven signal-to-noise threshold into multivariable predictive modeling. Evaluation of Stabl on synthetic datasets and five independent clinical studies demonstrates improved biomarker sparsity and reliability compared to commonly used sparsity-promoting regularization methods while maintaining predictive performance; it distills datasets containing 1,400 to 35,000 features down to 4 to 34 candidate biomarkers. Stabl extends to multi-omic integration tasks, enabling biological interpretation of complex predictive models, as it hones in on a shortlist of proteomic, metabolomic, and cytometric events predicting labor onset, microbial biomarkers of preterm birth, and a pre-operative immune signature of post-surgical infections.

Dissecting responses to immunotherapy using high-dimensional single-cell analysis

R. Gottardo (raphael.gottardo@chuv.ch)

Biomedical Data Science Center, Lausanne University Hospital, Lausanne, Suisse

New single-cell technologies such as single-cell RNA-seq, CITE-seq, spectral flow cytometry, and spatial transcriptomics enable the unprecedented interrogation of single-cell phenotypes (and functions) under various biological conditions. A common statistical problem is the discovery and characterization of such cell phenotypes from single-cell data and their relationship to clinical endpoints (e.g., response rate or vaccine efficacy). During this talk, I will present new computational tools we have developed for high-dimensional single-cell data analysis. I will illustrate these novel approaches using several datasets that we have recently analyzed to characterize immune responses in the context of cancer immunotherapy.

Spectral cytometry characterization of cellular heterogeneity in the peritoneal fluid of women with endometriosis

F. Lenfant (francoise.lenfant@inserm.fr)

Équipe ESTER, INSERM U1297-I2MC, Toulouse, France

Endometriosis is an estrogen-dependent, chronic inflammatory gynecologic disease affecting women of reproductive age, with a therapeutic wandering of 6 to 10 years. It is characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterus. A better understanding of the initiation phase is a major challenge to improve diagnosis and treatment. The most widely accepted hypothesis to explain the formation of endometriotic lesions is the tubal retrograde reflux during menstruation. However, only 10% of the reproductive age women will develop endometriosis while 90% of women experience retrograde menstruation.

Because of the scarcity of stem cells among cells of retrograde menstruations, it seems likely that a supportive microenvironment at ectopic sites specifically in patients could favor the full establishment of endometriotic lesions during retrograde menstruation. This raises the question of the stem cells and of the immune cell diversity present in the peritoneal fluid in endometriotic patients as compared to healthy women.

Using spectral Flow cytometry Analysis (AURORA CS Cytex available at the cytometry/cell sorting platform, U1297, I2MC, TRI Genotoul), we adapted a twenty-nine panel markers based on the OMPI-069 to allow an extensive characterization of peritoneal fluid immune environment as it can identify more than 15 populations of immune cells in the peritoneal fluid of patients operated from endometriosis. We also designed a panel of antibodies to detect and characterize stem cells.

This project will compare the immune/stem cell populations present on peritoneal fluids of healthy women as compared to endometriotic patients at the different phase of the menstrual cycle. A better characterization of this cellular heterogeneity is needed to find biomarkers and to identify new avenues of targeted medical therapies for this highly frequent and understudied pathology.

This work is done in collaboration with Pr. E. Chantalat, Service de Chirurgie Gynécologique – CHU Rangueil-Toulouse and funded by the Endofrance Association and ANR-EDISON.

Régulation de l'immunité innée par les hormones sexuelles

S. Laffont-Pradines (sophie.laffont-pradines@inserm.fr)

INFINITY, Inserm/CNRS, Toulouse, France

Le sexe biologique influence les réponses immunitaires. De manière générale, les femmes développent des réponses immunes de plus fortes amplitudes et de meilleure qualité que les hommes. Les femmes sont ainsi globalement plus résistantes que les hommes aux infections, mais plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes et allergiques. L'asthme, pathologie inflammatoire chronique des voies aériennes, est la maladie respiratoire la plus fréquente. Les données épidémiologiques mettent en évidence un clair biais de sexe à la fois dans l'incidence et la sévérité de l'asthme avec une prédominance de femmes touchées par la maladie à l'âge adulte. En étudiant les mécanismes à l'origine des biais de sexe dans l'asthme dans des modèles murins qui récapitulent aussi les biais de sexe observés chez l'Homme, nous avons mis en évidence qu'il existait des différences liées au sexe pour une population jouant un rôle central dans l'initiation et la perpétuation des réponses de type 2, les cellules innées lymphoïdes de groupe 2 (ILC2). Ces cellules sont non seulement plus nombreuses dans les tissus de souris femelles mais produisent des quantités d'IL13 et d'IL5 supérieures à celles des ILC2 provenant de mâles. Nous avons mis en évidence que ces différences sont le fait, non pas des œstrogènes, mais du rôle inhibiteur des androgènes. En ce sens, les androgènes endogènes chez les mâles ou un traitement par des androgènes exogènes chez les femelles limitent le nombre et les fonctions des ILC2 ainsi que l'inflammation pulmonaire associée via l'activation intrinsèque de l'AR. Les androgènes, via l'AR, agissent donc comme un puissant régulateur négatif des ILC2s *in vivo*, ce qui pourrait contribuer au biais de sexe dans l'asthme allergique. La modulation de l'activité de l'AR dans les ILC2, ou ses cibles moléculaires en aval, pourrait donc représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans l'asthme allergique et d'autres pathologies associées aux ILC2s. Plus globalement, mieux comprendre l'impact des facteurs biologiques liés au sexe dans la physiologie pourra à terme contribuer à combler le fossé entre les sexes dans la recherche médicale et pourra conduire à une meilleure prise en charge des patients en prenant en compte leur sexe biologique.

Voyages spatiaux et immunité

J.-P. Frippiat (jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr)

Laboratoire Stress, Immunité, Pathogènes, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Les vols spatiaux constituent un environnement extrême qui affecte le système immunitaire d'environ 50 % des astronautes. Dans le cadre des futures missions spatiales de longues durées, telles que le déploiement d'une station en orbite lunaire (Lunar Gateway) et d'éventuelles missions interplanétaires, il est impératif de déterminer comment les différents composants du système immunitaire sont affectés afin de permettre la mise en place de contre-mesures préservant la santé des astronautes. Cette conférence présentera les moyens permettant d'étudier les effets d'une modification de la force gravitaire et les effets des vols spatiaux sur le système immunitaire, qui est crucial pour la survie des espèces, en se focalisant sur les lymphocytes T et B, ces derniers ayant été peu étudiés jusqu'à présent dans ces conditions ou lors d'expositions à des analogues terrestres des conditions spatiales. Préserver le système immunitaire des spationautes est un enjeu majeur pour les futures missions spatiales de longues durées.

Voyages spatiaux, muscle et métabolisme

Claire Laurens

Toulouse

Cytométrie microbienne et médecine

G. Gorochov (guy.gorochov@sorbonne-universite.fr)

CIMI-Paris, Sorbonne Université/Inserm, Paris, France

L'homéostasie hôte/microbiote peut être maintenant explorée par une approche qui combine cytométrie en flux, tri cellulaire et séquençage ADN à haut débit (Ig-Seq). Nous avons de cette manière élucidé le rôle joué par l'IgA chez les individus sains et les conséquences de son absence sur l'écologie microbienne de l'intestin dans les situations de déficit en IgA. Nous avons montré que l'IgM peut partiellement compenser le rôle de l'IgA, expliquant pourquoi le déficit sélectif en IgA (ne touchant pas les autres isotypes d'anticorps) est dans la plupart des cas cliniquement bien toléré. Nous avons toutefois observé, comme attendu, une légère sur-représentation des pathobiontes. D'une manière moins attendue, nous avons également observé une sous-représentation de nombreux symbiontes qui jouent typiquement un rôle bénéfique. Ces résultats soulignent le rôle crucial joué par l'IgA pour la préservation de la diversité commensale. D'autres résultats suggèrent maintenant que non seulement les bactéries mais d'autres membres du microbiome comme les champignons sont perturbés dans les situations de déficit en IgA, mais également dans d'autres maladies. Nous avons récemment montré en utilisant une approche appelée fungi flow que l'IgA interagit avec le mycobiome et particulièrement avec *Candida albicans*, de manière à contrôler ses capacités d'invasion épithéliale dans sa forme filamenteuse. Nous explorons à l'heure actuelle dans quelle mesure l'IgA pourrait également réguler l'organisation du virome intestinal.

Références :

1. Moreno-Sabater A, Sterlin D, Imamovic L, Bon F, Normand A.C, Gonin C, Gazzano M, Bensalah M, Dorgham K, Ben Salah E, Achera A, Parizot C, Rigourd V, Begue H, Dalle F, Bachmeyer C, Hennequin C, Yssel H, Malphettes M, Fieschi C, Fadlallah J, Gorochov G. Intestinal *Candida albicans* overgrowth in IgA deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2023. doi: 10.1016/j.jaci.2023.03.033.
2. Sterlin D, Fadlallah J, Adams O, Fieschi C, Parizot C, Dorgham K, Rajkumar A, Autaa G, El-Kafsi H, Charuel JL, Juste C, Jönsson F, Candela T, Wardemann H, Aubry A, Larsen M, Capito C, Brisson H, Tresallet C, Cummings RD, Larsen M, Yssel H, von Gunten S, Gorochov G. Human IgA binds a diverse array of commensal bacteria. *Journal of Experimental Medicine*. 2020. doi: 10.1084/jem.20181635.
3. Fadlallah J, El Kafsi H, Sterlin D, Juste C, Parizot C, Dorgham K, Autaa G, Gouas D, Almeida M, Lepage P, Pons N, Le Chatelier E, Levenez F, Kennedy S, Galleron N, Pais de Barros JP, Malphettes M, Galicier L, Boutboul D, Mathian A, Miyara M, Oksenhendler E, Amoura Z, Doré J, Fieschi C, Dusko Ehrlich SSD, Larsen M, Gorochov G. Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency. *Sci Transl Med*. 2018. doi : 10.1126/scitranslmed.aan1217.

26^e CONGRÈS ANNUEL DE L'ASSOCIATION FRANÇAISE DE CYTOMÉTRIE

15-17 novembre



CYTOMÉTRIE 2023



Centre de Congrès Pierre Baudis TOULOUSE

RÉSUMÉS DES COMMUNICATIONS

JEUDI 16 NOVEMBRE



Impact de la reprogrammation du métabolisme du céramide sur les lymphocytes infiltrants la tumeur et la réponse à l'immunothérapie

C. Colacios (celine.colacios@inserm.fr), A. Montfort, N. Andrieu, B. Ségui

CRCT, Toulouse, France

Le mélanome cutané constitue un problème majeur de santé publique en raison de son incidence croissante ainsi que de sa forte capacité à métastaser, mettant en jeu le pronostic vital du patient si la lésion n'est pas détectée précocement. La prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique a été révolutionnée par le développement des immunothérapies ciblant les points de contrôle immunitaire (immune checkpoint inhibitors; ICI) telles que les anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) et les anti-CTLA-4 (ipilimumab). Toutefois, la majorité des patients ne bénéficie pas de ces traitements et développe des effets secondaires majeurs. Les études permettant de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la réponse immune dans le mélanome doivent donc se poursuivre afin de proposer des combinaisons thérapeutiques plus efficaces.

Nos travaux ont montré que des altérations du métabolisme du céramide contribuent à la progression tumorale. Ce phénomène est associé à l'induction de mécanismes d'immunoéchappement et à la résistance aux ICI dans des modèles précliniques de mélanome, de cancers du poumon, du sein et du côlon.

Notamment, nous avons montré que les cellules de mélanome surexpriment fréquemment la sphingosine kinase 1 (SK1), une enzyme impliquée dans la production de sphingosine-1-phosphate (S1P), un oncométabolite. Nous avons mis en évidence par RNAscope qu'une forte expression de la SK1 dans les cellules de mélanome est significativement associée à une survie plus courte chez les patients traités par anti-PD-1 (nivolumab), suggérant que cette enzyme participe aux mécanismes de résistance et d'immunoéchappement. De plus, dans un modèle préclinique, nous avons montré par cytométrie en flux que l'inhibition de la SK1 permet d'augmenter la proportion de lymphocytes T CD8 activés et de diminuer la proportion de Treg. Cette inhibition permet aussi d'amplifier fortement l'efficacité des ICI (anti-CTLA-4 ou anti-PD-1), conduisant au rejet des tumeurs et à une amélioration significative de la survie.

À l'opposé, des analyses TCGA montrent que les mélanomes métastatiques expriment de très faibles niveaux du transcrite codant pour la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2), une enzyme impliquée dans la production de céramide, un anti-oncométabolite. Nous avons donc évalué l'effet de la surexpression de la nSMase2, sur la croissance du mélanome dans un autre modèle préclinique. Dans ce modèle, la surexpression de la nSMase2 diminue de 50% la croissance tumorale. Cet effet dépend de l'activité enzymatique de la nSMase2 car la surexpression d'un variant catalytiquement inactif de cette enzyme ne permet pas de ralentir la croissance des tumeurs. Dans ce contexte, l'augmentation de l'activité nSMase2 dans les tumeurs augmente l'infiltrat de lymphocytes T CD8 spécifiques et diminue la proportion de Treg dans les tumeurs. De plus, la surexpression de la nSMase2 augmente fortement l'efficacité des anti-PD-1 *via* la potentialisation des réponses immunes Th1.

En conclusion nous avons montré que la SK1 et la nSMase2 peut influencer la réponse immunitaire et la sensibilité aux ICI. Le rôle d'autres enzymes du métabolisme du céramide est en cours d'évaluation dans le mélanome et dans d'autres cancers afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse aux ICI et de proposer des traitements adaptés aux patients.

Références :

1. Montfort A, 2021, Cancer Immunol Res, Neutral Sphingomyelinase 2 Heightens Anti-Melanoma Immune Responses and Anti-PD-1 Therapy Efficacy.
2. Imbert C, 2020, Nat Commun, Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1.

Les vaisseaux HEV : des vaisseaux sanguins spécialisés qui permettent aux lymphocytes d'accéder aux tumeurs pendant l'immunothérapie

J.-P. Girard (Jean-Philippe.Girard@ipbs.fr)

IPBS-CNRS, Université de Toulouse, Toulouse, France

Introduction et Objectifs :

L'immunothérapie a révolutionné le traitement du cancer. Elle est basée sur l'utilisation d'anticorps bloquant les points de contrôle immunitaire CTLA-4 et PD-1, afin d'augmenter l'activité du système immunitaire du patient, notamment des lymphocytes T cytotoxiques. L'originalité de mon équipe est de s'intéresser aux mécanismes régulant l'entrée des lymphocytes dans les tumeurs, une étape absolument essentielle mais très peu étudiée jusqu'à présent.

Matériels et Méthodes :

Nous avons combiné différentes approches, notamment la cytométrie de flux (Blanchard* et al. STAR Protocols 2022), le séquençage sur cellule unique (scRNA-seq), la microscopie intravitale et l'immunohistochimie, afin d'étudier le rôle des vaisseaux sanguins dans le recrutement des lymphocytes dans les tumeurs.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Nous avons découvert que des vaisseaux sanguins spécialisés, apparentés aux vaisseaux HEV ('high endothelial venule') des organes lymphoïdes (Moussion et Girard, Nature 2011 ; Girard et al, Nat Rev Immunol 2012), constituent les portes d'entrée majeures pour les lymphocytes dans les tumeurs (Asrir* et al, Cancer Cell 2022). Nous avons montré que les vaisseaux HEV de tumeur (TA-HEV) ont un phénotype bi-fonctionnel unique, et constituent les portes d'entrée quasi-exclusives pour les lymphocytes dans différents modèles précliniques de tumeurs traitées par immunothérapie anti-PD-1/anti-CTLA-4. Chez l'homme, un score TA-HEV élevé dans les lésions de mélanome métastatique est associé à une meilleure réponse au traitement et à une survie plus longue des patients traités par immunothérapie anti-PD-1 plus anti-CTLA-4. Enfin, nous avons réalisé une preuve de concept dans un modèle préclinique qui a révélé qu'augmenter le nombre de vaisseaux TA-HEV et leur fonctionnalité, améliore l'efficacité de l'immunothérapie (Asrir* et al, Cancer Cell 2022). Ces derniers résultats suggèrent que la modulation des vaisseaux HEV dans les tumeurs, pourrait permettre d'augmenter l'infiltration lymphocytaire et rendre ainsi l'immunothérapie efficace chez un plus grand nombre de patients.

Références :

1. Asrir, A.*, Tardiveau, C.*, Coudert, J.*, Laffont, R.*, Blanchard, L.*, Bellard, E., Veerman, K., Bettini, S., Lafouresse, F., Vina, E., Tarroux, D., Roy, S., Girault, I., Molinaro, I., Martins, F., Scoazec, J.Y., Ortega, N., Robert, C. and Girard, J.P. (2022) Tumor-associated HEVs mediate lymphocyte entry into tumors and predict response to PD-1 plus CTLA-4 combination immunotherapy. *Cancer Cell*, 40:318-334 (*Co-first authors).
2. Blanchard, L.*, Vina, E.*, Asrir, A., Tardiveau, C., Coudert, J., Laffont, R., Tarroux, D., Bettini, S., Veerman, K., Lafouresse, F., Pichery, M., Mirey, E., Bellard, E., Ortega, N., and Girard, J.P. (2022) Flow cytometry analysis of endothelial cells and subsets of exhausted CD8+ T cells in murine tumor models. *STAR Protocols*, 3(2):101444 (* co-first authors).
3. Girard, J.P., Moussion, C., and Forster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 12, 762-773.
4. Moussion, C., and Girard, J.P. (2011). Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* 479, 542-546.

Deciphering tumor-specific T cells in Acute Myeloid Leukemia

Y. Simoni¹ (yannick.simoni@inserm.fr), L. Aziez², R. Vazquez², I. Boussaid², J. Decroocq², R. Birsen², C. Friedrich², M. Temple², O. Kosmider², D. Bouscary², M. Fontenay², N. Chapuis²

¹ *Hématopoïèse normale et pathologique, Institut Cochin, Paris, France*

² *Institut Cochin, Paris, France*

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous group of blood cancer. For the past decades, the standard of care treatment remained unchanged (i.e. Bcl-2 inhibitor, hypomethylating agents) and a large majority of patients still relapse and succumb to the disease, urging the need for better therapeutic approaches.

Here, we explore whether tumor-specific T cells response can be identified in AML patients and ultimately determine if a subgroup of patients could be candidates for immunotherapies treatment targeting T cells.

We used mass-cytometry (CyTOF) and single-cell TCR sequencing approach to characterize T cells.

Combining mass-cytometry, to deeply characterize T cells population in paired blood and bone marrow (BM) and TCR sequencing to characterize the TCR repertoire, we were able to identify a population of CD8+ T cells only present in the BM tissue that express several clonotypes specific to this cluster.

Identification of a population of CD8+ T cells only present in the bone marrow compartment. This population shows the hallmark of activation with a cytotoxicity defect. Next step: Confirm antigen specificity of these cells using an MHC class I tetramer screening approach.

Immunosurveillance des lésions préneoplasiques : hétérogénéité du neutrophile au cours de la carcinogénèse colorectale humaine

L. Moudombi¹ (lyvia.moudombi@lyon.unicancer.fr), M. Pereira Abrantes¹, M. Sarabi^{1, 2}, L. Tonon³, M. Hubert¹, C. Déglétagne⁴, T. Andrieu⁵, C. Audouy⁶, S. Boyault⁶, M. Ardin^{1, 3}, P. Duplouye¹, M. Scavino¹, C. Assaf^{1, 7}, L. Hermet¹, S. Soudja⁸, A. Dupré⁹, M. Rivoire⁹, P. Peyrat⁹, J. Berthet¹, V. Garbit¹⁰, D. Blehaut¹⁰, O. Raspado¹⁰, G. Garin¹¹, C. Renard¹², A. Viari³, C. Caux^{1, 7}, M.-C. Michallet¹

¹ INSERM 1052, CNRS 5286, Département TERI, Équipe CISTAR (Dr Caux), Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

² GELMAD (Groupe d'Exercice Libéral des Maladies de l'Appareil Digestif), Lyon, France

³ Synergie Lyon Cancer, Plateforme de bio-informatique 'Gilles Thomas', Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon, France

⁴ Plateforme de Single Cell, Plateforme Génomique des Cancers, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon, France

⁵ Plateforme de Cytométrie en flux, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon, France

⁶ Plateforme Génomique des Cancers, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon, France

⁷ Lab. d'Immunothérapie du Cancer de Lyon (LIICL), Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

⁸ INSERM 1052, CNRS 5286, Département TERI, Équipe Dr Marie, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

⁹ Département de chirurgie, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

¹⁰ Infirmerie Protestante de Lyon, Caluire-et-Cuire, France

¹¹ Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI), Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

¹² Département de Biopathologie, Centre Léon Bérard (CLB), Lyon, France

L'avènement des immunothérapies souligne l'importance d'une meilleure compréhension des mécanismes d'immunosurveillance et d'immunoéchappement de la transformation maligne. En effet, la réponse inflammatoire et l'infiltrat immunitaire sont des éléments clés dans l'initiation, le développement et le maintien du cancer, et de nombreuses études mettent en avant l'importance de l'inflammation chronique dans la progression tumorale ainsi que son influence sur la réponse aux traitements. Des publications récentes montrent un intérêt croissant pour les neutrophiles dans la recherche contre le cancer. Les neutrophiles sont des cellules de l'immunité innée décrites pour leur rôle pronostique et pourraient constituer un facteur prédictif de réponse aux immunothérapies. Cependant, leur rôle dans la carcinogénèse colorectale (CCR), qui représente la 3^e cause de décès par cancer, est peu documenté. Basé sur des résultats préliminaires, nous avons émis l'hypothèse que les neutrophiles jouaient un rôle dans l'immunosurveillance des lésions préneoplasiques et subissent des changements phénotypiques et fonctionnels au cours de la CCR.

Nous avons réalisé des analyses protéiques et transcriptomiques à partir de tissus colorectaux humains synchrones : tissu adjacent (TA), tissu pré-neoplasique (polypes, P) et adénocarcinome (ADK). L'infiltrat immunitaire et la quantification d'analytes pro-inflammatoires ont été évalués respectivement par des approches multiparamétriques de cytométrie en flux et de MSD. En parallèle, nous avons analysé les profils transcriptomiques des neutrophiles et de leurs partenaires cellulaires par séquençages de l'ARN à partir de populations triées (bulk RNAseq) ou à l'échelle de la cellule unique (single cell RNAseq, scRNAseq). Ces approches complémentaires nous ont permis de déchiffrer, pour la première fois, la plasticité et les interactions cellulaires des neutrophiles au cours de la CCR chez l'Homme. Les analyses de bulk RNAseq mettent en évidence une proximité transcriptomique du microenvironnement du P et de l'ADK qui pourrait expliquer la mise en place d'une niche pré-inflammatoire dans le P, et le recrutement important des neutrophiles au sein des ADK mesuré par cytométrie en flux. A l'inverse, les neutrophiles d'ADK présentent un profil transcriptomique différent des neutrophiles de P et de TA qui eux sont très similaires. Les analyses de sc RNAseq mettent en évidence une diversité des neutrophiles issus de TA/P/ADK avec l'identification de 8 clusters (C) dont la répartition varie en fonction du tissu, ce qui suggère une évolution phénotypique et fonctionnelle au cours de la CCR. Ainsi, le C2 est enrichi dans le TA et présente des propriétés fonctionnelles plutôt anti-tumorales, tandis que C1/C6 sont enrichis dans l'ADK avec des propriétés plutôt pro-tumorales (enrichissement en voies de stress et d'inflammation). De manière intéressante, aucun cluster ne prédomine dans le P ; ces résultats, associés aux analyses de bulk RNAseq, suggèrent que P est un stade intermédiaire dont le microenvironnement est décisif dans la plasticité transcriptomique des neutrophiles. Les analyses de trajectoires et d'interaction Ligand-Récepteurs à partir des données de scRNAseq devraient permettre une meilleure compréhension de cette plasticité, et la définition de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients atteints de CCR ne répondant pas aux immunothérapies.

Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress of lymphoblastoid cells: an intricate crosstalk between mitochondria, mitophagy and mitophagic cell death

P. X. Petit¹ (patrice.petit@inserm.fr), A.-S. Armand², N. E. Rainey¹

¹ CNRS UMR 8003 Paris University, SSPIN, Neuroscience Institute, team "Mitochondr, CNRS, Paris, France

² INSERM U1151, Institut Necker Enfants Malades (INEM), Campus Necker, Université, INSERM, Paris, France

Arsenic (As) is a natural element that exists in groundwater in highly toxic inorganic forms, mainly pentavalent arsenic (arsenate, As⁵⁺) and trivalent arsenic (arsenite, As³⁺), the latter being more toxic and mobile than the pentavalent form. Among the trivalent arsenic, two of them are of particular interest in the cancer field: sodium arsenite (NaAsO₂) and arsenic trioxide (ATO, As₂O₃). While both are toxic for the cells, studies on NaAsO₂ have mainly focused on its carcinogenic effect, and ATO has been highlighted for its anticancer properties. Once in the cell, arsenic induces formation of O₂⁻, H₂O₂, -OH, and ROO⁻. Formation of O₂⁻ and H₂O₂ in response to arsenic exposure in different cell lines is summarized by Shi *et al.* (10). Arsenic induces generation of ROS by several mechanisms: (i) Mitochondria: Mitochondrial complexes I and III in the electron transport chain are responsible for the production of O₂⁻. Arsenic shows mitochondrial toxicity by inhibiting succinic dehydrogenase activity and uncoupling oxidative phosphorylation with production of O₂⁻, which gives rise to other forms of ROS

New data indicates that ATO interact directly with the mitochondrial cardiolipin then destabilizing mitochondria bioenergetic. These observations suggest that NaAsO₂ and As₂O₃ may act via paradoxical ways to either promote or inhibit cancer pathogenesis. Here, we compared the cellular response of the two arsenical compounds, i.e., NaAsO₂ and As₂O₃, on the Burkitt lymphoma cell model, the Epstein Barr Virus (EBV)-positive P3HR1 cells. Using multiparametric flow cytometry analysis, classical biochemistry, electron microscopy and qPCR analysis, we showed that both compounds block cells in G₂/M, modify the cellular bioenergetics, induce ROS production, ER stress and cell death, at different levels, NaAsO₂ provoking a more deleterious effect to the cells than ATO. In contrast, ATO promotes a huge autophagy response, which probably delay As₂O₃-induced cell death, specifically in P3HR1+ cells. Our results emphasize arsenic trioxide (ATO) as an autophagic inducer which likely render the cells more prone to cell death when combined to other chemicals, such as all-trans retinoic acid in a context of cancer therapy. Whether this autophagic response depends on EBV reactivation is discussed.

Les mastocytoses et leur diagnostic : qui, quand, quoi, où, comment ?

L. Lhermitte (ludovic.lhermitte@aphp.fr)

Oncohématologie biologique, Hopital Necker Enfants Malades, Paris, France

Les mastocytoses systémiques correspondent à une maladie rare caractérisée par l'accumulation anormale de mastocytes dans différents tissus de l'organisme. Leur diagnostic repose sur un faisceau d'arguments intégrant entre autres la détection de mastocytes médullaires de phénotype anormal par cytométrie en flux. On estime que les mastocytoses systémiques représentent une maladie très nettement sous-diagnostiquée. Les points d'appel clinique peuvent être variables et insidieux, et chaque outil diagnostique peut présenter des difficultés pour le diagnostic. Cette session éducationnelle a pour objectif de faire le point en 2023 sur les formes clinico-pathologiques de cette maladie, souvent méconnues, contribuant au sous-diagnostic. Nous concentrerons l'exposé sur la détection des mastocytes par cytométrie et leur caractérisation normale ou pathologique. Le mastocyte représente en effet une cellule rare du tissu hématopoïétique si bien qu'il peut effectivement être difficile de l'identifier et de le caractériser. Nous replacerons nécessairement le critère diagnostique phénotypique parmi les autres critères, cytologique, moléculaire, biochimique et anatomo-pathologique, puisque c'est l'intégration de l'ensemble de ces paramètres et non l'interprétation isolée de la cytométrie qui permet d'aboutir à un diagnostic pertinent et une prise en charge thérapeutique adaptée.

Enfin, dans une dernière partie nous exposerons quelques cas difficiles différentiels difficiles que ce soit par ambiguïté de lignée comme la lignée basophile, ou par expansion mastocytaire significative mimant une mastocytose, ou encore par diagnostic d'interface avec plusieurs entités nosologiques.

Nous insisterons sur le diagnostic intégré et l'existence d'un réseau organisé pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces patients sur le territoire national qu'il convient de solliciter : Centre de Reference des MASTocytoses (CEREMAST).

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies myéloïdes

CALCRL : nouveau marqueur des cellules souches leucémiques et cible thérapeutique pour lutter contre les rechutes dans les leucémies aiguës myéloïdes

N. Guiraud (nathan.guiraud@inserm.fr)

METAML, CRCT - UMR1037 INSERM, Toulouse, France

Ces dernières années, de nouvelles armes thérapeutiques contre les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ont émergées, promettant de radicalement améliorer le pronostic vital de ces patients. Néanmoins, malgré l'arrivée de ces nouvelles molécules, les rechutes restent fréquentes. Mieux comprendre les cellules souches leucémiques (CSL) chimiorésistantes à l'origine de la rechute est donc un enjeu crucial pour combattre la maladie. Notre équipe a précédemment démontré qu'*in vivo*, le phénotype de ces cellules est hétérogène et qu'elles ne sont pas nécessairement enrichies à la maladie résiduelle post-chimiothérapie, mais qu'une sous-population de CSL résistantes persiste et permet le redéveloppement leucémique.

Dans des premiers travaux, nous avons identifié par une analyse *in silico* le gène *CALCRL* comme surexprimé à la rechute, dans les CSL, et de mauvais pronostic dans les LAM. Nous avons pu montrer que l'inactivation du récepteur *CALCRL* affectait le développement et la survie leucémique *in vitro* et *in vivo*. Nous avons également mis en évidence son ligand, l'adrenomédulline (ADM), comme impliqué dans la progression leucémique. Plus précisément, des expériences de clonogénie et de dilutions limites (DL) *in vivo* ont montré que *CALCRL* est impliqué dans les fonctions souches leucémiques. Nous avons également montré que ce récepteur régule le cycle cellulaire *via* le facteur de transcription E2F1 et contribue à la survie cellulaire en régulant le facteur pro-apoptotique BCL2 ainsi que par la réparation des dommages à l'ADN. Enfin, l'inactivation de *CALCRL* sensibilise à la chimiothérapie conventionnelle *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, nous avons donc identifié le récepteur *CALCRL* comme un nouveau marqueur des CSL chimiorésistantes.

Dans une seconde étude, nous avons voulu mieux comprendre les fonctions de *CALCRL* en caractérisant directement la population cellulaire exprimant fortement ce récepteur (*CALCRL*^{High}) chez les patients LAM. Nous avons pour cela trié, au sein du même patient au diagnostic, la population primaire exprimant fortement *CALCRL* : *CALCRL*^{High}, et la population *CALCRL*^{Low}, l'exprimant pas ou peu. Premièrement, nous avons prouvé que le corécepteur RAMP2 est exprimé chez les patients LAM. Son invalidation mime également l'effet anti-leucémique observé en invalidant *CALCRL*, ce qui semble indiquer que l'axe ADM/*CALCRL*/RAMP2 est impliqué dans la progression leucémique. De plus, nous avons montré que la population primaire *CALCRL*^{High} est fonctionnellement enrichie en cellules souches, ainsi que phénotypiquement par des marqueurs souches de surface, comparé à la population *CALCRL*^{Low}. Cette population semble également avoir un profil inflammatoire lié à l'âge et engagée en différenciation *via* un phénotype de pseudo-sénescence. Celle-ci possède en outre un métabolisme énergétique et oxydatif très important.

La population *CALCRL*^{High} caractérise ainsi une population souche inflammatoire qui va préexister au diagnostic et être surexprimée à la maladie résiduelle. Cibler ces cellules semble donc être une voie très prometteuse pour combattre la rechute dans les LAM.

Références :

1. Larrue Clément, Nathan Guiraud, Pierre-Luc Mouchel, Marine Dubois, Thomas Farge, Mathilde Gotanègre, Claudie Bosc, et al. 2021. « Adrenomedullin-CALCRL Axis Controls Relapse-Initiating Drug Tolerant Acute Myeloid Leukemia Cells ». *Nature Communications* 12 (1): 422.
2. Guiraud et al., 2023 in submission.

Analyse par cytométrie en flux du dépôt de C3d sur les hématies de patients HPN traités par inhibiteurs de la fraction C5 du complément

A. Debliquis¹ (debliquisa@ghrmsa.fr), M. Le Garff-Tavernier², M. Loosveld³, O. Wagner-Ballon⁴, B. Drénou⁵

¹ Laboratoire d'Hématologie, Groupe Hospitalier de la région Mulhouse Sud alsace (GHRMSA), Mulhouse, France

² Service d'Hématologie biologique, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, AP-HP, Paris, France

³ Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Universitaire de la Timone, Marseille, France

⁴ Département d'Hématologie et d'Immunologie biologiques, Hôpitaux universitaires Henri Mondor, Créteil, France

⁵ Service clinique d'Hématologie, Groupe Hospitalier de la région Mulhouse Sud alsace (GHRMSA), Mulhouse, France

Introduction :

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est une maladie clonale acquise de la cellule souche hématopoïétique avec diminution d'expression des protéines GPI-liées à la surface cellulaire. Le déficit en protéines inhibitrices du complément (CD59, CD55) sur les hématies est responsable d'une hémolyse intravasculaire (HIV) associée à un risque de thrombose. Le traitement par inhibiteur de la fraction C5 du complément (anti-C5) a révolutionné le pronostic des patients présentant une HPN classique mais certains d'entre eux restent anémiques, voire dépendants des transfusions. Les causes possibles de cette résistance thérapeutique sont l'insuffisance médullaire, l'HIV résiduelle et une hémolyse extravasculaire (HEV) induite par l'anti-C5. En effet, sous l'action de l'anti-C5, le C3d, produit d'activation du C3, s'accumule à la surface des hématies GPI déficitaires entraînant leur destruction par les macrophages hépatospléniques¹. Les nouveaux inhibiteurs proximaux du complément préviennent ce phénomène. L'objectif de ce travail est de mettre au point l'analyse de l'expression du C3d sur les hématies des patients traités par anti-C5 par cytométrie en flux (CMF) qui pourrait donc présenter un intérêt thérapeutique.

Matériels et Méthodes :

Une revue de la littérature a permis de répertorier les anticorps reconnaissant la fraction C3d à la surface des hématies, utilisables en CMF et pouvant s'intégrer dans le panel de détection de clone HPN mis en place dans notre laboratoire et correspondant aux recommandations nationales et internationales² (CD235a-FITC clone KC16 Beckman et CD59-PE clone MEM-43, EXBIO). La mise au point a été réalisée à l'aide de sujets sains (contrôle négatif) et de patients atteints de la maladie des agglutinines froides (contrôle positif) avant l'analyse de patients HPN. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'hématies C3d positives parmi les hématies HPN de type III.

Résultats :

Trois anticorps anti-C3 disponibles en France ont été testés : un anticorps non conjugué C3d³ (Quidel) nécessitant un anticorps secondaire couplé au BV421 (AffiniPure Donkey anti-Mouse IgG), et deux anticorps conjugués, le C3-FITC⁴ (MP Biomedicals), et le C3d-APC⁵(Assay Pro). Ces différents anticorps ont été analysés simultanément avec la combinaison CD235a-FITC/CD59-PE à l'exception du C3-FITC qui n'a été testé qu'avec le CD59-PE. L'analyse des contrôles négatifs et positifs a révélé des résultats concluants avec le C3d non conjugué et le C3d-APC. Les deux panels validés sont donc : CD235a-FITC/CD59-PE/C3d-APC ou C3d+anti mouse BV421. Parmi les différents patients HPN testés à ce jour, le pourcentage de C3d présents sur les hématies type III est très variable (de 0% à >50%). Les résultats sont similaires avec les deux anti-C3d testés, la technique avec l'anticorps non conjugué étant plus longue (2h30 vs 1h30).

Conclusion :

Ce travail a permis de mettre au point l'analyse de la fraction C3d sur les hématies par CMF. L'ajout d'un seul anticorps au panel recommandé pour le diagnostic et le suivi de l'HPN sur les hématies, est facilement implantable dans les laboratoires de biologie médicale. Diffusée aux membres du groupe CytHem-HPN, cette analyse réalisée sur une série plus importante de patients HPN permettra d'évaluer sa pertinence clinique en terme de prédiction de la résistance aux anti-C5 et/ou de la réponse aux inhibiteurs proximaux.

Références :

1. Risitano AM et al. Blood. 2009 Apr 23;113(17):4094-100.
2. Sutherland DR et al. Cytometry B Clin Cytom. 2018 Jan;94(1):23-48.
3. Shields KJ et al. PLoS One. 2017 Mar 31;12(3):e0174577.
4. Lingjun Zhang et al. Leukemia. 2021 Apr;35(4):1176-1187.
5. Risitano AM et al. Haematologica. 2021 Dec 1;106(12):3188-3197.

Les rares cellules présentant un déficit en protéines GPI-liées peuvent être considérées comme un véritable clone HPN selon les données de l'Observatoire National des clones HPN

M. Le Garff-Tavernier^{1, 2} (magali.legarff@aphp.fr), J.-P. Vial³, T. Boyer⁴, N. Chapuis⁵, V. Harrivel⁶, A.-C. Lhoumeau⁷, E. Bera⁸, I. Kittler⁹, M. Loosveld¹⁰, G. Socié¹¹, R. Peffault de Latour¹¹, B. Drenou¹², A. Debliquis¹², O. Wagner-Ballon^{13, 14}

¹ Service Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP Sorbonne Université, Paris, France

² UMRS 1138 Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Paris, France

³ Laboratoire d'Hématologie, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

⁴ Laboratoire d'Hématologie, CHU Lille, Lille, France

⁵ Laboratoire d'Hématologie, CHU Cochin, AP-HP Centre - Université Paris Cité, Paris, France

⁶ Laboratoire d'Hématologie, CHU Amiens, Amiens, France

⁷ Laboratoire d'Hématologie, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France

⁸ Laboratoire d'Hématologie, CHU Rouen, Rouen, France

⁹ Laboratoire d'Hématologie, CHU de La Réunion, La Réunion, France

¹⁰ Laboratoire d'Hématologie, CHU Timone, Marseille, France

¹¹ Service d'Hématologie Clinique, Hôpital Saint Louis, AP-HP Nord - Université Paris Cité, Paris, France

¹² Laboratoire d'Hématologie, Groupe Hospitalier de la Région Mulhouse Sud Alsace, Mulhouse, France

¹³ Département d'Hématologie et d'Immunologie Biologiques, Hôpital Henri Mondor, AP-HP Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

¹⁴ Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France

Introduction :

Les recommandations internationales^{1,2} préconisent la détection et le suivi des clones HPN (Hémoglobinurie paroxystique nocturne) à l'aide d'une analyse par cytométrie en flux (CMF) de haute sensibilité. Les rares cellules HPN sont définies comme des cellules déficientes en protéines GPI-liées quantifiées de 0,01% à <0,1% et se distinguent des clones HPN minoritaires dont la taille varie de 0,1% à 1%. La pertinence clinique ainsi que l'évolution à long terme des rares cellules HPN restent à déterminer.

Méthodes :

Tous les patients présentant un clone HPN ou de rares cellules HPN $\geq 0,01\%$, détectés par CMF du 29/02/2016 au 28/02/2021, étaient éligibles pour l'inclusion dans l'Observatoire National des Clones HPN.

Résultats :

En 5 ans, 41 centres ont inclus 637 patients avec un clone HPN évalué sur les neutrophiles $\geq 0,01\%$ dont 163 présentaient de rares cellules HPN ou un clone HPN minoritaire. Une réanalyse des données par les deux investigatrices a permis la validation de 138 patients, 18 fichiers (11 %) ayant été exclus car ne correspondant pas à un véritable clone HPN selon les recommandations internationales : 49 patients présentaient de rares cellules HPN et 89 un clone HPN minoritaire avec une taille de clone significativement différente sur les 3 lignées (taille médiane sur les neutrophiles : 0,03 [0,01-0,09] vs 0,34 [0,1-0,97], $p < 0,0001$; monocytes : 0,03 [0-7,88] vs 0,50 [0-7,08], $p < 0,0001$; hématies : 0,01 [0-1,36] vs 0,08 [0-1,24], $p = 0,0096$). L'âge médian des patients au diagnostic était similaire pour les deux groupes. Les diagnostics ont été établis entre 2010 et 2021 avec des informations cliniques disponibles dans 98 % des cas. La majorité (92 à 94 %) des patients des deux groupes présentaient une insuffisance médullaire : aplasie médullaire ($n=30/47$ vs $61/88$), syndrome myélodysplasique ($n=2$ vs 6) ou une (ou plusieurs) cytopénie(s) inexpliquée(s) ($n=11$ vs 16). Seuls 4 cas de thrombose ont été observés dans le groupe « rares cellules HPN » vs 3 pour le groupe « clone HPN minoritaire » et les 2 cas d'anémie hémolytique appartenaient à ce dernier groupe. Une thrombopénie plus sévère a été observée dans le groupe « clone HPN minoritaire » (68 [2-356] vs 44 [2-308] G/l) sans différence significative pour les autres paramètres biologiques. Le suivi à long terme (69/138 patients) jusqu'à 7 ans a montré que 28% des patients du groupe « rares cellules HPN » et 33% du groupe « clone HPN minoritaire » présentait une augmentation de la taille du clone avec changement de groupe (0,1%-1% vs $>1\%$). Les autres patients présentaient un clone de taille stable avec une diminution pour une minorité, la disparition du clone n'étant observée qu'en cas de greffe de cellules souches hématopoïétiques ($n=5$).

... / ...

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies myéloïdes

Conclusion :

Cette étude multicentrique n'a montré aucune différence entre la présentation clinique et biologique des patients présentant de rares cellules HPN ou un clone HPN minoritaire. Le suivi à long terme met en évidence que les rares cellules HPN peuvent évoluer vers un clone minoritaire, ce qui suggère qu'elles peuvent être considérées comme de véritables clones HPN.

Références :

1. Borowitz. et al, 2010, Cytometry B Clin Cytom, 211-230.
2. Illingworth. et al 2018, Cytometry B Clin Cytom, 49-66.

Un flux d'hémopathies

J. Vo Xuan^{1,2} (juliette.voxuan@aphp.fr), S. Tarfi^{1,3}, I. Sloma^{1,3}, N. Abermil^{4,5}, S. Maury^{6,7}, N. Lefèvre-Bultingaire¹, V. Tran Quang^{1,3}, N. Freynet¹, O. Wagner-Ballon^{1,3}, B. Badaoui¹

¹ Département d'Hématologie et Immunologie biologiques, Pôle Biologie-Pathologie, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

² Laboratoire de Biologie médicale, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil, France

³ INSERM, IMRB, Université Paris Est Créteil, Créteil, France

⁴ Service d'Hématologie biologique, Hôpital Saint-Antoine (AP-HP), Paris, France

⁵ Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, Sorbonne Université, Paris, France

⁶ Département d'Hématologie, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

⁷ Université Paris Est Créteil, Créteil, France

Introduction et Objectifs :

M. N, 75 ans, a été adressé au laboratoire d'Hématologie pour la réalisation d'un myélogramme afin d'explorer une anémie arégénérative et une thrombopénie chroniques, faisant suspecter un syndrome myélodysplasique (SMD). Son hémogramme retrouvait une monocytose relative et absolue et confirmait l'anémie arégénérative et la thrombopénie. Le frottis sanguin retrouvait quelques signes de dysgranulopoïèse sans cellule anormale. Ses frottis médullaires étaient riches, avec de nombreux mégacaryocytes, sans excès de blastes et mettaient en évidence une importante dysmyélopoïèse. Les LDH étaient élevées à 1100 U/l. L'association de la monocytose sanguine et de la dysmyélopoïèse médullaire évoquaient une leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC). Notre objectif était de mettre en évidence le caractère pathologique de cette monocytose par cytométrie en flux.

Matériels et Méthodes :

Une étude immunophénotypique de la répartition des sous-populations monocytaires sanguines a été réalisée selon les recommandations de la classification OMS 2022. La stratégie de fenêtrage permet la quantification relative des trois sous-populations monocytaires (monocytes classiques cMo CD14++CD16-, intermédiaires iMo CD14++CD16+ et non classiques ncMo CD14faible/-CD16+) en excluant les autres populations leucocytaires, notamment celles se superposant aux ncMo. Cette exclusion est possible grâce à l'utilisation d'anticorps de lignée ciblant les lymphocytes T, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (PNN, PNE), l'éventuelle myélémie ainsi que les lymphocytes B. Un histogramme bi-paramétrique CD14/CD16 élimine ensuite les cellules résiduelles doublement négatives CD14-CD16-(polynucléaires basophiles et cellules NK).

Résultats, Discussion et Conclusion :

Un contingent important de PNN CD16-CD24-a été détecté (65% des PNN). Le frottis sanguin examiné n'avait pourtant pas mis en évidence de myélémie ni de PNE, deux populations CD16- qui auraient pu correspondre au nuage de granuleux CD16- identifié. Cette découverte fortuite d'un déficit combiné en CD16 et CD24, deux protéines GPI-liées, sur les PNN a fortement fait suspecter la présence d'un clone d'Hémoglobineurie Paroxystique Nocturne (HPN). Le phénotypage monocyttaire a été rendu ininterprétable en raison du déficit important en CD14 et en CD16, deux protéines GPI-liées sur les monocytes, entraînant une sous-estimation des trois populations monocytaires. Un bilan d'hémolyse complet a ensuite réalisé révélant une haptoglobine effondrée et confirmant l'élévation des LDH. Une recherche de clone HPN, étudiant l'expression d'autres protéines GPI-liées (FLAER, CD55 sur les leucocytes, CD59 sur les hématies) a confirmé la présence attendue d'un clone majoritaire sur les PNN, les monocytes et les hématies. Le diagnostic d'hémopathie myéloïde a été confirmé par les données cytogénétiques (trisomie du chromosome 14) et moléculaires (mutations des gènes *U2AF1*, *SETBP2*, *MPL*).

Ce cas illustre l'association déjà rapportée entre SMD/LMMC et HPN, indépendamment de la présence d'une hémolyse chez les patients atteints (1,2,3). La Haute Autorité de Santé recommandait déjà en 2015 la recherche d'un clone de HPN chez tous les patients atteints de SMD. Ce cas souligne donc : (i) la nécessité de rechercher systématiquement un clone de HPN lors d'un diagnostic de SMD/LMMC; (ii) l'importance de la sélection des anticorps lors de la conception des panels et des protocoles d'analyse pour le diagnostic fortuit d'associations d'hémopathies, surtout lorsque de telles associations sont déjà rapportées par la littérature et non suspectées par le clinicien.

... / ...

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies myéloïdes

... / ...

Références :

1. Van Kamp et.al., 1994, Br J Haematol, Myelodysplasia following paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: evidence for the emergence of a separate clone, 87:399–400.
2. Longo et al.,1994, Br J Haematol., Myelodysplasia in a patient with pre-existing paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a clonal disease originating from within a clonal disease, 87(2):401–3.
3. Kaiafa et al., 2008, Ann Hematol., Detection of CD55- and CD59-deficient granulocytic populations in patients with myelodysplastic syndrome, 87(4):257-62.

Incidence des phénotypes aberrants dans les leucémies aiguës en Côte d'Ivoire : étude préliminaire

H. Y. E. Kassi-Kablan¹ (bahenoh@gmail.com), M. Sangare-Bamba², A. R. J. N'guessan-Blaoui³, I. Kamara⁴, M. E. Yayo-Aye⁵

¹ Laboratoire CeDReS, CHU Treichville, Abidjan, Côte d'Ivoire

² Laboratoire central, CHU Yopougon, Abidjan, Côte d'Ivoire

³ Laboratoire, Institut National de Santé Publique, Abidjan, Côte d'Ivoire

⁴ Hématologie clinique, CHU Yopougon, Abidjan, Côte d'Ivoire

⁵ UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Felix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire

Introduction :

Au fil des dernières décennies, la cytométrie en flux (CMF) a considérablement amélioré la précision du diagnostic des leucémies aiguës (LA) en révélant des marqueurs cellulaires spécifiques. Bien que les cellules leucémiques partagent généralement des caractéristiques communes avec leurs homologues normales, elles présentent fréquemment une expression anormale d'antigènes non caractéristiques de leur lignée, phénomène appelé «expression d'antigène aberrant». L'incidence de ce phénomène au sein des LA est sujette à des variations, et son lien avec les facteurs pronostiques biologiques demeure sujet à controverse. L'objectif principal de cette étude était d'explorer l'incidence des phénotypes aberrants chez les patients diagnostiqués avec des leucémies aiguës.

Méthodes :

En collaboration avec les laboratoires DASLABOR et CeDReS, ainsi que le service d'hématologie clinique du CHU de Cocody en Côte d'Ivoire, nous avons mené une étude descriptive entre mars 2022 et août 2023. Cette étude a porté sur 13 patients qui présentaient soit une hyperleucocytose et /ou des symptômes cliniques évocateurs d'une leucémie aiguë.

Dans le cadre de cette étude, nous avons réalisé des hémogrammes (Sysmex XN-550) et effectué des analyses d'immunophénotypage par cytométrie en flux (Navios Beckman Coulter). Les lignées cellulaires en prolifération ont été identifiées grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques couplés à des fluorochromes. Les résultats ont été interprétés en conformité avec la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en vigueur en 2016

Résultats :

Nous avons identifié 10 cas de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et 3 cas de leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). Une altération de la lignée a été observée dans 6 des 9 cas de LAM, caractérisée par l'expression anormale de l'antigène lymphoïde CD7. L'antigène CD13 a été détecté dans 1 cas de LAL. L'expression asynchrone a été principalement observée au sein des LAM, avec une expression inhabituelle des antigènes CD117/CD34/CD13/CD14 dans 4 des 10 cas des LAM (4/9).

Conclusion :

La recherche de phénotypes aberrants revêt une importance fondamentale lors du diagnostic des LA, contribuant ainsi à établir des pronostics plus précis et à orienter une prise en charge plus adaptée, notamment dans le contexte de la thérapie ciblée.

Références :

1. Louati, N., Koubaa, A., Fakhfakh, Y., Mnif, S., Sannenna, H., & Mnif, H. (2022). Aberrant expression of CD5 in a case of B acute lymphoblastic leukemia-positive Philadelphia chromosome. *La Tunisie Médicale*, 100(10), 726.
2. Belhadj, M., Lakhal, F., Elborgi, W., Fekih, S. S., Kefi, S., Meddeb, B., & Gouider, E. (2021). Immunophenotyping features of Tunisian adult acute lymphoblastic leukemia. *Journal de l'Information Médicale de Sfax*, 10.
3. Jaddaoui, S., & Oukkache, B. (2021). Phénotype aberrant Ddes Leucémies aiguës: Experience de CHU Casablanca-Maroc. *Revue Marocaine de Santé Publique*, 8(13).
4. Jmili, N. B., Souguir, S., Yacoub, S., Khelif, A., & Kortas, M. (2009, September). Étude du profil antigénique des blastes au cours des leucémies aiguës lymphoblastiques: analyse de 152 cas par cytométrie en flux. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 67, No. 5, pp. 543-551).
5. Gentil Noémie. (2021). Evaluation de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans les leucémies aiguës myéloïdes: expérience du laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille (Doctoral dissertation).

Profils phénotypiques et évolutifs des tailles des clones de l'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne dans les Aplasies Médullaires Acquisées

S. Oukid (oukids2020@gmail.com), N. Rekab, K. M. Benlabiod, F. Lamraoui, S. Taoussi, Y. Moussa Bouchakor, H. Brahimi, C. Boucherit, C. Guezlane, M. Mezroud, A. A. Ziani, A. Rebouh, Z. Bouchetara, M. T. Abad, M. Bradai

Service Hématologie, EHS ELCC Blida, Faculté de Médecine, Université, Laboratoire de recherche sur les Hémopathies Malignes et les Hémoglobinopathie, Blida, Algérie

Introduction :

Des études récentes ont montré que 20 à 25% des Aplasies Médullaires (AM) présentent un clone d'Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN).

Nous rapportons 175 observations d'AM où le clone HPN a été recherché et suivi par cytométrie de flux (CMF).

Matériels et Méthodes :

C'est une étude faite de 2009 à Juillet 2023. Le clone HPN est recherché par CMF dès le diagnostic d'AM de façon systématique. L'analyse du degré du déficit utilise le CD59a sur globules rouges (GR), le CD24 et le Flaer sur les polynucléaires neutrophiles (PNN) et le CD14 et le Flaer sur les monocytes (Mono). Le diagnostic de certitude d'HPN est retenu si on détecte plus de 5% des cellules déficitaires sur au moins deux lignées. Une surveillance par CMF est indiquée en cas d'absence de déficit ou en cas d'un déficit très modéré ou touchant une seule lignée.

Nous avons analysé 175 cas d'AM. Il s'agit de 87 femmes et 88 hommes avec une moyenne d'âge de 36,2 ans (15-79). L'AM est modérée : 108 cas (61,7%) et sévère : 66 cas (37,7%). Le délai moyen écoulé pour assurer l'immunophénotypage par CMF pour le diagnostic d'HPN : 32 mois (0 -196).

Résultats :

Dans 132 cas (75.6%) absence de clone, et **41 cas** (23.4%) présence d'un clone HPN. Il s'agit de 16 femmes et 25 hommes avec une moyenne d'âge de 37.3 ans (17-70). L'AM est modérée dans 26 cas (63.4%) et sévère dans 15 cas (36.6%). Le déficit est partiel (II) : 03 cas (7.3%), total (III) : 30 cas (73.2%) et Mixte : 08 cas (19.5%).

Le degré moyen du déficit :

GR : analyse faite chez 40 cas : CD59: 16.8% (0.1-82)

PNN : analyse faite chez les 41 cas : 46.73% (5.33-99)

Monocytes : analyse faite chez les 31 cas : 34.1% (0.2-97)

Chez 40 patients, on a noté un déficit d'un marqueur sur une seule lignée, d'où indication d'un suivi par un immunophénotypage par CMF tous les 06 mois.

Discussion :

La CMF a été déterminante pour le diagnostic d'HPN dans sa forme aplasante (23.4%) rejoignant les données de la littérature (20 à 25%). Dans le groupe de déficit modéré ou d'absence de clone le suivi de la taille du clone est nécessaire, cela a été vérifié dans notre étude puisque dans 10 cas, un clone a été diagnostiqué. Cet intérêt de suivi a été confirmé par l'étude de B. Höchsmann qui a démontré lors de suivi de 155 cas une augmentation significative du clone dans 28% des cas et dans 9% des cas apparition d'un nouveau clone.

Au cours de l'évolution, on a noté une augmentation de la taille du clone chez 10 cas.

Conclusion :

La CMF est actuellement systématique devant toute aplasie médullaire. La CMF est l'examen clé dans le diagnostic des HPN et dans quelques cas il faudra répéter la recherche du clone après une première analyse négative. La CMF est une technique très sensible et plus spécifique que les tests traditionnels dans le diagnostic et le suivi du clone HPN.

Références :

1. B. Höchsmann et al. Ann Hematol. 2011.

Mystère à Philadelphie

H. Guerineau¹ (hippolyte.guerineau@aphp.fr), M. Hammami², J. Lambert², E. Ronez¹, V. Raggieneau¹, J. Osman¹

¹ Laboratoire d'Hématologie, Centre hospitalier de Versailles - André Mignot, Versailles, France

² Service d'Hématologie, Centre hospitalier de Versailles - André Mignot, Versailles, France

Une patiente de 41 ans consulte dans le cadre du suivi d'une neuropathie héréditaire familiale amyloïde avec suspicion de progression clinico-électrique et neurologique. Cliniquement, la patiente présente un syndrome anémique isolé sans syndrome hémorragique ni infectieux et il n'y a pas de syndrome tumoral. A l'hémogramme, on note une anémie à 9,8 g/dL (VU: 12–16 g/dL), une neutropénie à 0.35 G/L (VU: 1,5–7 G/L) et très rares blastes circulants.

Devant ces anomalies, un myélogramme est réalisé retrouvant une moelle pauvre, infiltrée par 39% de blastes et un excès de basophiles dystrophiques. L'immunophénotypage retrouve des blastes CD34+/38+/117+/123+/HLA-DR+, TDT+, cCD3- et MPO-. Ils co-expriment des marqueurs myéloïdes CD13+/33+, lymphoïdes B CD19+/22+ (expression faible et partielle) et de manière aberrante les antigènes CD5+/7+. Le caryotype met en évidence un chromosome Philadelphie par t(9;22)(q34.1;q11.2), confirmé par l'identification d'un transcrit rare de BCR::ABL1 (nano BCR::ABL1 e6a2) en biologie moléculaire. Le séquençage haut-débit a mis en évidence des mutations sur les gènes *RUNX1* et *ASXL1*. Le diagnostic final retenu est celui d'une leucémie aiguë myéloïde avec t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR::ABL1 (LAM Ph+).

A l'issue de la première cure de chimiothérapie combinant fludarabine, cytarabine, idarubicine, et du ponatinib, un myélogramme est effectué. Celui-ci est infiltré par 64% de blastes ainsi qu'un contingent de cellules présentant une expansion cytoplasmique et des vacuoles pouvant évoquer des cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC). L'immunophénotypage confirme la présence de 8% de pDC matures CD123+fort/CD4+/CD56-/CD45RA+/HLA-DR+/CD303+/CD304+/NG2-/cTCL1-//CBadLamp- (confirmé par le centre de référence du CHU de Besançon et rétrospectivement retrouvées au diagnostic). Au total, ce phénotype médullaire est en faveur d'une LAM avec un excès de pDC matures (*Mature Plasmacytoid Dendritic Cell Proliferation*, MPDCP). Étonnement, le caryotype était normal et l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) ne montrait pas de remaniements d'*ABL1* et *BCR*, ce qui fait soupçonner l'émergence d'un clone Ph-, non présent au diagnostic. Un traitement de rattrapage a été débuté, associant azacitidine et venetoclax.

Les MPDCP associées à une hémopathie sont très rares (80 cas publiés), plus fréquemment diagnostiquées chez l'homme avec un âge médian au diagnostic de 69 ans, et constamment de mauvais pronostic. L'hémopathie myéloïde la plus souvent associée est la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), mais des associations avec des syndromes myélodysplasiques ou des LAM ont aussi été rapportées, avec une incidence fréquente des mutations de *RUNX1*.

Nous décrivons ici, à notre connaissance, le seul cas de MPDCP associé à une LAM Ph+.

Leucémie aiguë promyélocytaire typique : les « roots » sont de retour. À propos de 2 cas récentsO. Sakalian¹ (oliver.sakalian@chu-bordeaux.fr), A. Mimoun¹, T. Leguay², D. Lara³, J.-P. Vial¹¹ Laboratoire d'hématologie, CHU de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque, Pessac, France² Service d'Hématologie et Thérapie Cellulaire, CHU de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque, Pessac, France³ Service d'Hématologie, CH Libourne, Hôpital Robert Boulin, Libourne, France**Introduction et Objectifs :**

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) se caractérise par l'expansion clonale de blastes bloqués au stade promyélocytaire et, dans sa forme classique, par la translocation t(15;17) dont les divers points de cassure Bcr1, Bcr2 ou Bcr3 sont à l'origine d'un gène de fusion *PML::RARA*. Son diagnostic, le plus souvent évoqué sans grand risque d'erreur en cytomorphologie, relève de l'urgence en raison du risque hémorragique élevé en phase aiguë de la maladie et permet l'initiation de l'ATRA. La cytométrie en flux n'est pas incontournable dans ces situations mais apporte une réponse rapide dans les cas douteux. Nous rapportons ici 2 cas de LAP typiques avec t(15;17) classique mais avec un profil immunophénotypique peu commun.

Patients et Méthodes :

Les deux patients consultent récemment devant l'apparition d'un syndrome hémorragique cutanéomuqueux et une CIVD clinico-biologique. Le premier patient était leucopénique et le deuxième hyperleucocytaire. Dans les 2 cas le myélogramme est envahi par des blastes contenant parfois des fagots de corps d'Auer et dont l'aspect évoque une LAP. Le diagnostic de LAP a été confirmé à chaque fois par FISH avec mise en évidence de la t(15;17). Le premier patient avait une cassure de type Bcr3 et a bien répondu au traitement par ATRA. Le deuxième patient est encore en cours d'induction par ATRA et a également reçu 3 doses de debulking d'Idarubicine devant la faible décroissance initiale de la blastose.

Immunophénotypage :

Patient 1 : ciblage CD45/SSC faible atypique de 21% de blastes de profil cMPO+, CD117+/CD34+ (sous-clonal), cCD13+ CD33+, HLA-DR-, et CD38- (sous-clonal). Parmi les blastes, 43% présentent un phénotype de type LSC CD34+ CD38- CD117+ CD2+ (sous-clonaux).

Patient 2 : ciblage CD45/SSC fort typique de 83% de blastes de profil cMPO+, CD117+/CD34+ (sous-clonal), cCD13+ CD33+, HLA-DR-, et CD38- (sous-clonal). Parmi les blastes, 31% présentent un phénotype de type LSC CD34+ CD38- CD117+ CD99+ CD2+ cCD3+ (sous-clonaux).

Dans les deux cas, la présentation n'était pas en faveur d'une forme variante.

Discussion et Conclusion :

Chez ces deux patients, la positivité CD34+CD38- pourrait être en lien avec la présence de cellules souches leucémiques (LSC), inhabituelle et peu décrite dans les LAP. Le point de cassure Bcr3 du transcrit *PML::RARA* pourrait expliquer ce phénomène, ce type de cassures étant d'avantage associées à la présence de LSC dans les LAP.

L'expression aberrante de CD2 est relativement retrouvable dans les LAP. En revanche, chez le second patient, l'expression intracytoplasmique associée de CD3 est bien plus rare et plutôt associée aux cas « variants » ainsi qu'à l'hypothèse de l'origine cellulaire des blastes de LAP (en provenance d'un progéniteur à double potentiel lymphoïde/myéloïde ; la transformation T survenant dans une population cellulaire engagée dans une différenciation myéloïde). L'expression de CD99 observée chez le deuxième patient est décrite dans 50% des LAM mais pas dans la LAP.

Des rencontres surprenantes de profils phénotypiques inhabituels dans les LAP, y compris dans les présentations hémato-cytologiques typiques, renforcent le souvenir des origines discutées des LSC dans les LAP, légitimant de nouvelles études dans le but de poursuivre l'optimisation de leur pronostic.

... / ...

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies myéloïdes

... / ...

Références :

1. Grimwade D, Enver T. Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia*. 2004 Mar;18(3):375-84. doi: 10.1038/sj.leu.2403234. PMID: 14737069.
2. Edwards RH, Wasik MA, Finan J, Rodriguez R, Moore J, Kamoun M, Rennert H, Bird J, Nowell PC, Salhany KE. Evidence for early hematopoietic progenitor cell involvement in acute promyelocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 1999 Dec;112(6):819-27. doi: 10.1093/ajcp/112.6.819. PMID: 10587705
3. Chapiro E, Delabesse E, Asnafi V, Millien C, Davi F, Nugent E, Beldjord K, Haferlach T, Grimwade D, Macintyre EA. Expression of T-lineage-affiliated transcripts and TCR rearrangements in acute promyelocytic leukemia: implications for the cellular target of t(15;17). *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3484-93. doi: 10.1182/blood-2005-09-009977. Epub 2006 Jul 20. PMID: 16857994.
4. Plesea A, Correlation between multiparameter flow cytometry pattern and BCR molecular breakpoint, ESSCA, September 2016
5. Vijaya Pooja Vaikari, Miran Jang, Mojtaba Akhtari, Houda Alachkar; CD99 Is Highly Expressed in Acute Myeloid Leukemia (AML) and Presents a Viable Therapeutic Target. *Blood* 2016; 128 (22): 1540. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.1540.1540>

Apport de la cytométrie de flux dans le diagnostic des leucémies aiguës : À propos de 5 cas pédiatriques

N. E. H. Toumi (prnourelhouda@gmail.com), H. Zarrouk, H. Jouini

laboratoire hématologie, Hôpital d'enfants Béchir Hamza de Tunis, Tunis, Tunisie

Introduction et Objectif :

Les leucémies aiguës (LA) représentent un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes aiguës. Selon l'origine du précurseur impliqué dans l'expansion clonale, myéloïde ou lymphoïde (B ou T). L'immunophénotypage (IP) des cellules blastiques au niveau de la moelle osseuse ou du sang périphérique est indispensable au diagnostic de ces hémopathies malignes.

Dans le présent travail, nous nous sommes proposés de présenter des cas de leucémies aiguës où l'IP a permis de poser le diagnostic.

Patients et Méthodes :

5 cas de LA ayant bénéficié d'un myélogramme et d'un immunophénotypage sur cytomètre de flux (Beckmann Coulter Navios® et BD FACSLyrics).

Résultats :**Observation 1 :**

Nourrisson de sexe féminin âgé de 15 mois avec un aspect cytologique en faveur d'une LA lymphoblastique. L'IP a révélé une LA de phénotype mixte : myéloïde et lymphoïde B (CD34+, CD117+, CD13+, CD33+, CD19+, cCD22+, cCD79a+).

Observation 2+3 :

Deux nourrissons de sexes masculins âgés respectivement de 10 mois et de 2 ans, diagnostiqués LA avec des blastes à cytoplasme très basophile, de contour régulier, renfermant de grosses granulations (30%), négatifs à la myéloperoxydase. L'IP a posé le diagnostic d'une LA mégacaryoblastique (CD 41+, CD61+, CD36+).

Observation 4 :

Nourrisson de sexe masculin âgé de 11 mois diagnostiqué LA avec 85% de blastes polymorphes et vacuolés au niveau médullaire faisant suspecter une LA lymphoblastique. L'IP a mis en évidence une LA érythroblastique (CD36+, CD71+ et CD58+).

Conclusion :

La cytométrie en flux est un examen clé dans le diagnostic des leucémies aiguës, intégrée aux examens de routine de ces pathologies.

Detection of tumor-derived extracellular vesicles interactions with immune cells is dependent on EV-labeling methods

L. Loconte^{1, 2} (luisa.loconte@curie.fr), D. Arguedas¹, R. El¹, A. Zhou^{1, 3}, A. Chipont⁴, L. Guyonnet⁴, C. Guerin^{3, 4}, E. Piovesana^{1, 5}, J. L. Vázquez-Ibar⁶, A. Joliot¹, C. Théry^{1, 3}, L. Martín-Jaular^{3, 7}

¹ Inserm U932, Immunity and Cancer, Institut Curie, PSL University, Paris, France

² Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Istituto Pasteur Italia, Fondazione Cenci Bolognetti, Rome, Italy

³ CurieCoretech Extracellular Vesicles, Institut Curie centre de recherche, Paris, France

⁴ CurieCoretech Cytometry Platform, Institut Curie centre de recherche, Paris, France

⁵ Laboratories for Translational Research, EOC, Laboratory for Aging Disorders, Belinzona, Switzerland

⁶ Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, France

⁷ Immunity and Cancer, Institut Curie, PSL University, Inserm U932, Paris, France

Cell-cell communication within the complex tumor microenvironment is critical to cancer progression. Tumor-derived extracellular vesicles (TD-EVs) are key players in this process. They can interact with immune cells and modulate their activity, either suppressing or activating the immune system. For example, TD-EVs can drive the differentiation of monocytes towards myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (1), suppress effector T cell function, generate anergic-like state in natural killer T cells (NKT) (2); Furthermore, NKG2DLs+ EVs can lead to the activation of NK cells, after transient stimulation, while persistent stimulation leads to sustained NKG2D downmodulation and reduction of NK cell responsiveness (3). Conversely, TD-EVs exhibit immune stimulatory properties under some circumstances by transferring major histocompatibility complexes (MHCs) to dendritic cells (DCs), which results in the activation of T cells that impair tumor progression (4).

Deciphering the interactions between TD-EVs and immune cells is essential to understand immune modulation by cancer cells. Fluorescent labeling of TD-EVs is a method of choice to study such interaction. Various EV labeling strategies have been developed to study TD-EV interaction and uptake by immune cells. One of the most common methods consists in the labeling of EV membrane with fluorescent lipophilic membrane dyes. Other EV components such as proteins can be targeted using permeable chemical compounds that enter the EV lumen or by genetic tagging of EV proteins with a fluorescent reporter (5).

This work aims to determine the impact of EV labeling methods on the detection by imaging flow cytometry and multicolor spectral flow cytometry of EV interaction and capture by the different immune cell types within human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). EVs released by the triple-negative breast carcinoma cell line MDA-MB-231 were labeled either with the lipophilic dye MemGlow-488 (MG-488), Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE), or through ectopic expression of a MyrPalm-superFolderGFP reporter (mp-sfGFP), which incorporates into EVs during their biogenesis. Our results show that these labeling strategies, although analyzed with the same techniques, led to diverging results. While MG-488-labeled EVs incorporate in all cell types, CFSE-labeled EVs are restricted to a minor subset of cells and mp-sfGFP-labeled EVs are mainly detected in CD14+ monocytes which are the main uptakers of EVs and other particles, regardless of the labeling method. Furthermore, our results show that the method used for EV labeling influences the detection of the different types of EV interactions with the recipient cells. Specifically, MG-488, CFSE and mp-sfGFP result in observation suggesting, respectively, transient EV-PM interaction that results in dye transfer, EV content delivery, and capture of intact EVs. Consequently, the type of EV labeling method has to be considered as they can provide complementary information on various types of EV-cell interaction and EV fate.

Références :

1. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin J-P, et al. 2010 Feb. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest.* 120(2):457–71.
2. Deng Z-B, Zhuang X, Ju S, Xiang X, Mu J, Liu Y, et al. 2013 Apr. Exosome-like nanoparticles from intestinal mucosal cells carry prostaglandin E2 and suppress activation of liver NKT cells. *J Immunol.* 190(7):3579–89.
3. Vulpis E, Loconte L, Peri A, Molfetta R, Caracciolo G, Masuelli L, et al. 2022 Jan. Impact on NK cell functions of acute versus chronic exposure to extracellular vesicle-associated MICA: Dual role in cancer immunosurveillance. *J Extracell vesicles.* 11(1):e12176.
4. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, et al. 2001 Mar. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* (3):297–303.
5. Verweij FJ, Balaj L, Boulanger CM, Carter DRF, Compeer EB, D'Angelo G, et al. 2021 Sep 26. The power of imaging to understand extracellular vesicle biology in vivo. *Nat Methods.* 18(9):1013–26.

Le complexe dendrogénine A/LXRβ différencie les cellules tumorales pour libérer de petites vésicules extracellulaires immunogènes anti-tumorales enrichies en exosomes

J. Bunay (julio.bunay-noboa@inserm.fr), M. Record, L. Pucheu, S. Ayadi, M. Poirot, P. de Medina, S. Silvente-Poirot

Equipe INOV : « Métabolisme du Cholestérol et Innovations Thérapeutiques », INSERM-UMR 1037, CNRS-UMR 5071, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France

Objectifs :

Les petites vésicules extracellulaires (sEV), de 30 à 150 nm de diamètre, sont libérées par tous les types de cellules. Elles sont appelées « exosomes » lorsqu'elles sont formées dans les corps multi vésiculaires (CMV). Les sEV sécrétés par les cellules normales jouent un rôle bénéfique dans la surveillance de l'intégrité des tissus et la réponse immunitaire, tandis que les sEV sécrétés de manière constitutive par les cellules cancéreuses contribuent à inhiber les défenses immunitaires et à favoriser la progression et l'agressivité tumorale. De ce fait, il existerait un grand intérêt à reprogrammer les fonctions des sEV tumoraux vers des fonctions normales, sans affecter les sEV issus des cellules normales. Nous avons émis l'hypothèse que cela pourrait être réalisé en induisant la re-différenciation des cellules tumorales. La dendrogénine A (DDA) est un dérivé endogène du cholestérol et une nouvelle classe de ligand des récepteurs nucléaires (LXRα et LXRβ). Elle induit la re-différenciation des tumeurs et l'inhibition de leur croissance, associées à une infiltration intra tumorale des cellules dendritiques (CD) et des lymphocytes T (LT). Dans la présente étude, nous avons étudié si la DDA, à des concentrations induisant la re-différenciation des cellules tumorales, pouvait reprogrammer les sEV tumoraux, afin de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale.

Matériels et Méthodes :

Nous avons caractérisé l'impact de la DDA sur la sécrétion, le contenu et l'immunogénicité des sEV tumoraux sécrétés par les lignées cellulaires de mélanome murin, B16F10 et B16K1, et sur les cellules humaines SKMEL28 (mutées sur Braf) compétentes ou déficientes pour l'expression du LXRβ *in vitro* et *in vivo*. Les sEV sécrétés par les cellules tumorales sont purifiés par centrifugations différentielles et ultracentrifugation du milieu de culture. Le contenu des sEV est analysé par cytométrie en flux, immunocapture, microscopie électronique et immunoblotting. Les cellules immunes sont analysées par cytométrie en flux.

Résultats et Conclusion :

Nous avons montré que la DDA redifférencie les cellules tumorales en agissant via le LXRβ. Ceci a pour conséquence, une augmentation de la formation des CMV dans les cellules et une sécrétion accrue des sEV enrichis en exosomes (appelés DDA-sEV), ayant un contenu modifié par rapport aux sEV contrôles. En particulier, les DDA-sEV ont une charge élevée en antigènes de différenciation, en signaux « mangez-moi », en LC3-II et en bis(monoacylglycéro) phosphate (BMP), un phospholipide spécifique des endosomes et des sEV. De plus, les DDA-sEV inhibent de manière significative la croissance des tumeurs *in vivo*, et induisent une infiltration accrue dans les tumeurs des CD et des LT anti-tumoraux. Ex vivo, nous avons montré que les DDA-sEV sont plus captés par les CD que les sEV contrôles, et qu'ils favorisent la maturation des CD et leurs propriétés à activer les LT. Ces effets sont abolis lorsque les DDA-sEV sont sécrétés par des cellules tumorales déficientes en LXRβ. L'ensemble de ces données montrent que le complexe DDA/LXRβ modifie la production, le contenu et les fonctions des sEV tumoraux enrichis en exosomes, qui stimulent l'immunité anti-tumorale.

La cytométrie en flux pour étudier l'interaction entre périlipines et gouttelettes lipidiques

J. Cazareth (cazareth@ipmc.cnrs.fr), A. A. Bello, A. R. Dias Araujo, J. Bigay, B. Antony

Université Côte d'Azur - CNRS IPMC UMR7275, Valbonne, France

Dans les cellules, les gouttelettes lipidiques (LDs) sont des organelles au centre des échanges lipidiques, du métabolisme et de l'homéostasie énergétique. Leur architecture consiste en un cœur de lipides neutres, encapsulé dans une monocouche de phospholipides et de protéines.

Parmi les protéines connues pour interagir avec les LDs, les périlipines sont les plus abondantes. Les membres de la famille des périlipines présentent des différences dans leur distribution tissulaire et subcellulaire, leur mode de régulation et leurs profils d'interaction.

Notre équipe étudie la courbure et la rigidité membranaire ainsi que les interactions protéines-lipides dans différents contextes cellulaires et pour différentes organelles. Récemment, nous nous sommes intéressés aux gouttelettes lipidiques.

Dans un premier temps, nous avons établi un système ternaire minimal (périlipine/ phospholipide/ huile) pour préparer des gouttelettes lipidiques artificielles (aLDs) de taille et de densité définies et pour lesquels nous pouvons appliquer une déformation transitoire. Ce protocole nous permet de tester les effets combinés de la composition lipidique et de la tension de surface des gouttelettes lipidiques sur la liaison des protéines.

En combinant l'imagerie photonique, les expériences de flottaison et une analyse par cytométrie en flux nous avons établi que les périlipines 1, 2 et 3 présentent des affinités pour les gouttelettes lipidiques artificielles très différentes. Nous proposons que ces différences d'affinité, notamment de sensibilité à la composition lipidique et à la tension de surface, offrent à la cellule la possibilité de contrôler la surface des gouttelettes de façon très large et spécifique selon l'état de différenciation de la cellule.

Quelle place pour la cytométrie en flux des leucémies aigües lymphoblastiques en 2023 ?

L. Lhermitte¹ (ludovic.lhermitte@aphp.fr), I. Arnoux²

¹ *Oncohématologie biologique, Necker Enfants Malades, Paris, France*

² *Laboratoire d'hématologie, CHU La Timone, Marseille, France*

Les leucémies aigües lymphoblastiques (LAL) sont des proliférations clonales de cellules lymphoïdes immatures des lignées T ou B. La cytométrie en flux multiparamétrique (CMF) tient une place importante dans sa prise en charge depuis les années 80. Elle permet en effet un diagnostic précis de lignée et du stade de développement grâce à un panel d'anticorps selon les recommandations internationales. Celles-ci ont évolué avec le temps et il est important de rappeler la stratégie moderne d'affiliation de lignée pour une caractérisation précise des LAL.

La mesure de la maladie résiduelle minimale (MRM) est ensuite devenue un élément majeur de la prise en charge des leucémies au cours des traitements. Elle peut être réalisée par CMF avec une sensibilité de 10^{-3} à 10^{-5} selon les caractéristiques phénotypiques de la leucémie au diagnostic. La mesure de la MRM repose sur la mise en évidence d'antigène exprimés différemment par les cellules blastiques et les cellules lymphoïdes de régénération (hématogones pour la lignée B) : modulation d'expression, expression aberrante ou asynchronisme de maturation. Ceci permet de définir le « phénotype associé à la leucémie » ou LAIP (leukemia associated immunphenotype). La mesure de la MRM impose certains prérequis pour une réalisation optimale lesquels seront discutés.

Enfin l'utilisation grandissante de l'immunothérapie pour le traitement des LAL ces dernières années modifie beaucoup le profil d'expression des cellules blastiques et représente un véritable enjeu pour la détection des éléments pathologiques résiduels. En particulier des modulations phénotypiques majeures peuvent être observées avec disparition du CD19 après Blinatumomab ou CART cells. Les stratégies pour pallier à ces difficultés seront également abordées.

Cette session éducationnelle fera le point tant sur les LAL-B que les LAL-T pour préciser le positionnement de la cytométrie en flux en 2023. Quelle est sa valeur diagnostique et ses limites ? Quels sont les enjeux, actuels pour une évaluation de la maladie résiduelle ? Peut-elle avoir une valeur théranostique jusque-là inutilisée ? Nous développerons aussi les efforts d'harmonisation réalisés sur le territoire depuis 2005 pour optimiser le choix et l'association des LAIP, le choix des fluorochrome, et la détection des blastes sous immunothérapie.

Utilisation d'un arbre de décision hybride pour identifier les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

I. Vergnolle (vergnolle.ines@iuct-oncopole.fr)

Laboratoire d'hématologie, CHU Toulouse IUC, Toulouse, France

Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B sont très hétérogènes, mais ils présentent des caractéristiques cliniques et biologiques communes. La présentation clinique, la cytologie, l'immunophénotypage, la cytogénétique et la biologie moléculaire sont utilisés dans le diagnostic différentiel, mais les résultats restent parfois équivoques. Dans cette étude, nous proposons une nouvelle approche utilisant l'intelligence artificielle sur des données de cytométrie en flux pour classer les lymphomes B matures. L'utilisation d'outils mathématiques associée à une expertise biologique nous a permis de générer un arbre de décision facile à utiliser et qui permet non seulement de faire la distinction entre LLC et non LLC, mais aussi de proposer un diagnostic de lymphome B plus précis avec seulement 4 marqueurs.

Références :

1. Vergnolle I, Ceccomarin T, Canali A, Rieu JB, Vergez F. Use of a hybrid intelligence decision tree to identify mature B-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2023 Aug 4. doi: 10.1002/cyto.b.22136. Epub ahead of print. PMID: 37539849.
2. Hoffmann J, Rother M, Kaiser U, Thrun MC, Wilhelm C, Gruen A, Niebergall U, Meissauer U, Neubauer A, Brendel C. Determination of CD43 and CD200 surface expression improves accuracy of B-cell lymphoma immunophenotyping. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2020;98:476–482.
3. Sorigue M, Juncà J, Sarrate E, Grau J. Expression of CD43 in chronic lymphoproliferative leukemias. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2018;94:136–142.
4. Falay M, Afacan Öztürk B, Güneş K, Kalpakçı Y, Dağdaş S, Ceran F, Özet G. The Role of CD200 and CD43 Expression in Differential Diagnosis between Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma. *Turk. J. Haematol. Off. J. Turk. Soc. Haematol.* 2018;35:94–98.
5. Breiman L, Friedman J, Olshen R, Stone CJ. *Classification and Regression Trees.* In: 1983.

Le CD25 : un marqueur de transformation des lymphomes T cutanés ?

V. Arzul¹ (vincent.arzul@aphp.fr), A. Beldi¹, O. Beganovic², R. Vazquez³, C. Ratnam¹

¹ Hôpital Henri Mondor, Créteil, France

² Hôpital Necker, Paris, France

³ Hôpital Cochin, Paris, France

Introduction et Objectifs :

Nous rapportons le cas de Monsieur J âgé de 84 ans, adressé en médecine interne pour exploration d'une hyperlymphocytose d'évolution rapide (octobre 2020 : 4.8 G/L ; novembre 2021 : 13.5 G/L). Lors de l'examen clinique, une érythrodermie diffuse et très prurigineuse associée à des adénopathies multiples sans hépatosplénomégalie a été retrouvée, orientant le clinicien vers une phase circulante d'un lymphome T. Le bilan biologique a confirmé cette hyperlymphocytose avec une augmentation du taux des lactates déshydrogénases (539 UI/L). Le reste du bilan clinico-biologique était normal. Le frottis sanguin a objectivé la présence de cellules lymphoïdes majoritairement de petite taille, au noyau parfois irrégulier (incisé), à la chromatine dense, au cytoplasme peu abondant et moyennement basophile dont l'aspect cytologique ne permettait pas d'orientation diagnostique. En parallèle, un immunophénotypage lymphocytaire a été réalisé afin de déterminer la nature de cette hémopathie.

Matériels et Méthodes :

Un échantillon de sang total a été analysé sur le cytomètre semi-automatisé « AQUIOS CL » (Beckman Coulter) permettant la quantification des sous-populations lymphocytaires T, B et NK. Devant l'hypothèse d'un lymphome T, les marqueurs suivants ont été testés sur le cytomètre « Navios » (Beckman Coulter) : CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD10, CD25, CD26, KIR3DL2 (CD158k), TRBC1.

Résultats, Discussion et Conclusion :

L'immunophénotypage a mis en évidence une population T CD3+ CD4+ CD8- représentant environ 6.8 G/L. L'étude des marqueurs pan-T ne montrait pas d'aberration phénotypique. L'absence de perte des marqueurs CD7 et CD26 associée à la négativité du KIR3DL2 n'étaient pas en faveur d'un syndrome de Sezary (SS), lymphome T le plus fréquemment retrouvé en circulation. La population T CD4+ exprime majoritairement le marqueur CD25. Une positivité du CD25 oriente vers un lymphome/leucémie à cellules T de l'adulte (ATLL), lié à une infection par le virus HTLV1. Toutefois la négativité de la sérologie HTLV1 a réfuté cette hypothèse. La monotypie de cette population a été confirmée par l'étude du TBRC1.

Une première biopsie de peau d'interprétation délicate orientait vers un mycosis fongoïde (MF) transformé sans pouvoir éliminer un SS transformé, un lymphome T angio-immunoblastique (devant l'expression de marqueurs Tfh) ou un lymphome type PTCL NOS TFH. Devant l'errance diagnostique et la complexité du cas, le dossier a été discuté lors de plusieurs réunions de concertation pluridisciplinaire afin de retenir au final l'hypothèse d'un MF transformé. Ce cas illustre un lymphome T difficile à classer avec un profil immunophénotypique atypique. Le CD25, chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-2 est physiologiquement exprimé à la surface des lymphocytes activés. Une positivité de ce marqueur a orienté en premier lieu vers un ATLL qui est quasi-constamment associé à son expression avant d'être étiqueté comme un MF transformé. Nonobstant, le CD25 peut être positif dans les cas de MF, tout particulièrement en cas de transformation, ainsi que dans d'autres lymphomes T comme la leucémie pro lymphocytaire T (environ 30% des cas).

Étude comparative des dosages de l'IL-10 et IL-6 par Cytometric Bead Array (CBA) sur FACSCanto II et Navios Ex dans le cadre du diagnostic et du suivi des Lymphomes Oculo-Cérébraux (LOC)

L. Gerber¹ (CMF@ghrmsa.fr), Y. Renard¹, N. Kamel^{2,3}, E. Sourdeau^{2,3}, G. Ahle^{4,4}, C. Houillier^{5,6}, C. Soussain^{7,8}, K. Hoang-Xuan^{5,6}, M. Le Garff-Tavernier^{2,3}, A. Debliquis¹

¹ Laboratoire d'Hématologie, Groupe Hospitalier de la région Mulhouse Sud Alsace, Mulhouse, France

² Service d'Hématologie Biologique, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, AP-HP, Paris, France

³ Sorbonne Université, INSERM UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

⁴ Service de Neurologie, Hôpitaux Civils de Colmar, Colmar, France

⁵ Service de Neurologie 2 Mazarin, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France

⁶ Sorbonne Université, Inserm, CNRS, UMR S 1127, ICM, IHU, Paris, France

⁷ Service d'Hématologie Clinique, Institut Curie, site de Saint Cloud, Paris, France

⁸ INSERM U932, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France

Introduction :

Les lymphomes oculo-cérébraux (LOC) sont des tumeurs agressives nécessitant un diagnostic rapide¹. Les dosages des interleukines (IL) IL-10 et IL-6 par une technique de cytométrie en flux (CMF) appelée Cytometric Bead Array (CBA) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), l'humeur aqueuse ou le liquide vitré (LV) présentent un intérêt au diagnostic et dans le suivi des patients. Les valeurs seuils d'interprétation sont publiées avec cette technique, qui permet d'analyser plusieurs IL sur un faible volume. En France, ces dosages sont actuellement effectués au laboratoire de biologie médicale de référence (LBMR) de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière AP-HP et le groupe CytHem-LOC a pour projet de proposer un maillage territorial. L'objectif de ce travail est de mettre au point cette technique au laboratoire de l'hôpital de Mulhouse reconnu dans ce domaine^{2,3}.

Matériels et Méthodes :

Deux aliquots de 100µl chacun de 49 LCR et de 2 LV, au diagnostic ou lors d'un suivi, ont été congelés dans les 6 heures après le prélèvement. Les dosages des IL ont été réalisés en double à Mulhouse et au LBMR après envoi en carboglace. L'IL-10 et l'IL-6 sont dosées en série par la technique CBA avec les kits IL-10 Flex set et IL-6 Flex set (BD Biosciences) sur un cytomètre FACSCantoII (BD Biosciences) au LBMR et sur un Navios Ex (Beckman Coulter) à Mulhouse. Chaque série comprend une gamme d'étalonnage de 13 points, 2 contrôles internes et jusqu'à 35 échantillons de patients. Les résultats sont rendus en pg/ml à l'aide du logiciel FCAP Array (zones de linéarité = 2.5 à 5000 pg/ml). Pour l'interprétation des résultats, le score ISOLD⁴ est calculé pour les LV. Pour les LCR, un taux d'IL-10 <4 pg/ml n'est pas en faveur d'un LOC⁵, un taux >10 pg/ml est en faveur d'un LOC en prenant en compte le ratio IL-10/ IL-6.

Résultats et Conclusion :

Concernant l'IL-6, 11 échantillons sont ≤3 pg/ml, 1 est >5000 pg/ml dans les deux centres et un coefficient de corrélation $R^2 = 0.998$ est obtenu sur les 39 autres résultats. Concernant l'IL-10, 39 échantillons sont ≤3 pg/ml dans les deux centres et un coefficient de corrélation $R^2 = 0.988$ est obtenu sur les 12 autres résultats. Les interprétations sont concordantes sur les 2 LV avec un score ISOLD en faveur d'une absence de LOC. Pour les LCR, les interprétations sont concordantes pour 48/49 LCR : 41 LCR au diagnostic avec un seul prélèvement en faveur d'un LOC, 2 en zone de doute et 7 LCR de suivi présentant 1 augmentation et 6 diminutions par rapport aux antécédents. Un seul résultat de LCR présente une discordance minimale d'interprétation car les valeurs sont autour du seuil de l'IL-10 (=3 en faveur d'une absence de LOC au LBMR vs =4 zone de doute à Mulhouse).

En conclusion, les résultats obtenus sur les deux cytomètres dans les deux centres sont comparables sur cette série de 51 échantillons. Cette étude permet au groupe Cythem-LOC d'envisager d'implanter ces dosages d'IL-10 et d'IL-6 dans quelques centres experts pour faire bénéficier tous les patients de cette technique de référence.

Références :

- Houillier C et al. Neurology. 2020 Mar 10;94(10):e1027-e1039
- Debliquis A et al. Cytometry B Clin Cytom. 2018 Jan;94(1):182-188.
- Rimelen V et al. Acta Neuropathol Commun. 2019 Mar 18;7(1):43.
- Costopoulos M et al. Ophthalmology. 2016 Jul;123(7):1626-8.
- Nguyen-Them L et al. Eur J Cancer. 2016 Jul;61:69-76.

Diagnostic des Leucémies à grands lymphocytes granuleux par cytométrie en flux : Expérience du laboratoire d'hématologie CHU IBN ROCHD Casablanca

S. Addakiri^{1,2} (saraaddakiri1995@gmail.com), H. Bencharef^{1,2}, S. Jaddaoui³, A. I. Khadija², B. Oukkache^{1,2}

¹ Faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca, Université Hassan II, Casablanca, Maroc

² Laboratoire d'hématologie, CHU IBN ROCHD de Casablanca, Casablanca, Maroc

Introduction :

La leucémie à grands lymphocytes granuleux (large granular lymphocytes, LGL) correspond à un syndrome lymphoprolifératif rare caractérisé par une expansion clonale de lymphocytes T ou natural killer (NK). La classification OMS distingue trois entités. Les leucémies LGL ont une évolution le plus souvent indolente, se manifestent principalement par des cytopénies et sont fréquemment associées à des maladies auto-immunes. Son diagnostic se repose en général sur la présentation clinique et biologique. Nous rapportons deux cas de leucémie LGL diagnostiqués par la cytométrie en flux dans notre laboratoire.

Matériels et Méthodes :

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée au CHU Ibn Rochd de Casablanca sur une période de 2 ans ont été inclus 2 patients dont le diagnostic a été établie LGL diagnostiqués par un cytomètre en flux NAVIOS (BECKMAN COULTER) multiparamétrique (6 couleurs, 2 lasers) équipé du logiciel CXP en utilisant un panel d'orientation inclus les anticorps suivant : CD45/CD10/CD19/CD25/CD16/CD56/CD4/CD8 et un panel de diagnostic : CD38/CD7/CD5/CD3

Résultats :

Cas n°1 :

Il s'agit d'une patiente âgée de 44 ans qui consultait pour une tuméfaction douloureuse de l'orbite gauche évoluant dans un contexte d'apyrexie. Une biopsie a été réalisée et a révélé un lymphome T rétro-orbital non hodgkinien. La symptomatologie s'est aggravée avec l'apparition d'une pancytopenie : anémie à 6,6 g/dl, leucopénie à 580/mm³ avec neutropénie à 320/mm³ et thrombocytopénie à 29000/mm³ pour laquelle elle a bénéficié d'un myélogramme qui a objectivé la présence de 25 % de gros lymphocytes à grains. L'immunophénotypage médullaire a montré la présence d'une population lymphoïde SSC forte/intermédiaire CD 45 exprimant les marqueurs CD56+, CD16+, CD 38+, les autres marqueurs CD19, CD34, CD8, CD4, CD2, CD5, CD7, CD10, CD25, CD1a étaient négatif ; Le profil immunophénotypique était en faveur d'une expansion de la leucémie lymphoïde T-NK à gros grains.

Cas n°2 :

Il s'agit d'une jeune patiente âgée de 19 ans qui consultait pour une altération de l'état général avec une sensation de lourdeur au niveau de l'hypocondre gauche. L'examen clinique retrouvait une pâleur cutanéomuqueuse et une volumineuse splénomégalie arrivant au niveau de l'ombilic.

La formule sanguine a montré une hyperleucocytose à 19 160/mm³ avec une hyperlymphocytose à 14 430/mm³, une anémie normochrome normocytaire à 8,4 g/dl, une numération plaquettaire à 227 000/mm³. L'immunophénotypage du sang périphérique a révélé la présence de 98,1 % de lymphocytes T CD3+, de phénotype CD 56+, CD 16+, CD5+, CD7+, CD2+, CD4-, CD8+, CD25- et CD10-.

Conclusion :

La cytométrie en flux constitue un outil rapide et précis pour le diagnostic et de suivi de la majorité des hémopathies malignes dont les LGL ainsi qu'il permet de rechercher la signature cytotoxique de ces lymphocytes T ou NK.

Références :

1. Loughran TP. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 1993;82:1-14.
2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011;117:5019-32.
3. Mikael Roussel (2004). Leucémie lymphoïde T à grands lymphocytes granuleux: Conduite à tenir devant un excès de lymphocytes granuleux. *2004(360)*, 35-39.
4. Lazaro, E.; Duffau, P.; Chaigne Delalande, S.; Greib, C.; Pellegrin, J.-L.; Viillard, J.-F. (2013). Les leucémies à grands lymphocytes granuleux : de la clinique à la physiopathologie. *La Revue de Médecine Interne*, 34(9), 553-560.
5. Béné, Marie-Christine; Lacombe, Francis (2015). Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015(471), 35-41.

Profil épidémiologique, cytologique et phénotypique des leucémies à tricholeucocytes : Expérience du laboratoire d'hématologie CHU IBN ROCHD Casablanca Maroc

S. Addakiri^{1,2} (saraaddakiri1995@gmail.com), H. Bencharef^{1,2}, S. Jaddaoui², K. Ait Ichou², B. Oukkache^{1,2}

¹ Faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca Université Hassan 2, Casablanca, Maroc

² Laboratoire d'hématologie CHU IBN ROCHD Casablanca, Casablanca, Maroc

Introduction :

La leucémie à tricholeucocytes (HCL-C) est une hémopathie maligne rare, qui représente 2 % de l'ensemble des leucémies. Son diagnostic biologique repose sur l'identification des tricholeucocytes au niveau du frottis sanguin ou sur ponction sternale suivie d'une confirmation par immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF). Le but de cette étude est de caractériser le profil phénotypique des leucémies à tricholeucocytes diagnostiquées au sein du laboratoire d'hématologie du CHU IBN ROCHD et de le comparer avec la littérature.

Matériel et Méthodes :

Il s'agit d'une étude descriptive effectuée au niveau de notre laboratoire sur une période allant de 07-2015 au 07-2022, et qui a intéressé tous les patients présentant une HCL-C. Le diagnostic a été orienté par la mise en évidence des tricholeucocytes sur frottis, puis posé par le calcul du score immunologique de la leucémie à tricholeucocytes en attribuant 1 point pour chacun des 4 marqueurs suivants si leur expression est positive (CD103, CD11c, CD25, CD123), il est retenu lorsque le score est égal à 3 ou 4. L'immunophénotypage est réalisé par cytomètre Navios BeckMan Coulter à 6 couleurs et 2 lasers muni d'un logiciel CXP.

Résultats :

Douze patients ont été colligés avec un âge moyen de 60 ans, et un sexe ratio H/F de 11. Le frottis sanguin a montré la présence de cellules atypiques avec un noyau rond, parfois réniforme, une chromatine irrégulière, un cytoplasme clair, au contour mal limité, présentant des projections, réalisant un aspect chevelu évoquant des tricholeucocytes. L'immunophénotypage a été effectué sur prélèvement médullaire (58%) ou sur sang périphérique (42%). Un score de 3 a été trouvé chez 7 patients, contre 5 patients pour un score de 4. Le profil phénotypique des patients était uniforme et dominé par l'expression de CD20, CD19, CD79b, FMC7, CD103, CD11c, CD25, CD123 avec ± CD23 et la négativité de CD10 et CD5.

Discussion :

Pour le volet épidémiologique nos résultats rejoignent ceux décrits dans la littérature car en effet la HCL-C est une maladie de l'adulte avec une prédominance masculine. Les tricholeucocytes sont des lymphocytes B matures, qui phénotypiquement ne ressemblent à aucune sous population lymphocytaire B normale. Ces cellules expriment les marqueurs B (CD19, CD20, CD22 et CD200) sans expression du CD5 et du CD27. Le profil phénotypique de nos patients était homogène et ressemble à celui décrit dans la littérature.

Conclusion :

La HCL-C est une hémopathie maligne rare où l'utilisation de l'immunophénotypage par CMF est devenue incontournable. Elle peut être diagnostiquée facilement par la co-expression des marqueurs CD103, CD11c, CD123 et CD25 et présente un profil phénotypique invariable. L'acquisition de cette technique devient une nécessité même si elle reste relativement onéreuse.

Références :

1. Foucar K, Falini B, Catovsky D, Stein H. Leucémie à tricholeucocytes Dans : Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, eds. Classification OMS des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes. Lyon, France : Presses du CIRC ; 2008.
2. Robak T. Variante de la leucémie à tricholeucocytes : point de vue récent sur le diagnostic, la biologie et le traitement. Cancer Treat Rev. 2011 ; 37 (1):3-10.
3. Rousse M, Malet M, Troussard X, Leucémie à tricholeucocytes. Revue Francophone des Laboratoires, 2006, 379 : 19-20
4. Montserrat E, Chronic lymphoproliferative disorders. Curr Opin Oncol 1997 ; 9 : 34-41
5. B. Admou. Applications de la cytométrie en flux en biologie médicale. Journal de Biologie Médicale. Volume 9-Numéro 33. 9pages. (2020).

Un cas rare de leucémie à grands lymphocytes à grains CD4+

V. Arzul (vincent.arzul@aphp.fr)

Laboratoire d'Immunologie biologique, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France

Introduction et objectifs :

Nous rapportons le cas de Madame G âgée de 73 ans, adressée en hématologie clinique pour exploration d'une hyperlymphocytose avec présence d'un excès de lymphocytes à grains (LGL) au frottis sanguin. Lors de l'examen clinique, il n'a pas été mis en évidence de syndrome tumoral. Un bilan biologique de contrôle a été prescrit et ne retrouvait pas d'hyperlymphocytose (2.6 G/L en février 2023) ou de mention d'un excès de LGL au frottis. En parallèle, un immunophénotypage lymphocytaire à la recherche de LGL a été réalisé ainsi qu'une recherche de clonalité T. Seule une hyperlymphocytose T CD4+ à 1780 cellules/ μ L a été retrouvée. Ainsi, en l'absence d'excès de LGL au frottis sanguin et d'excès de lymphocytes T CD8+ ou de cellules NK (CD8 : 315 cellules/ μ L, NK : 164 cellules/ μ L), la recherche d'une leucémie à LGL n'a pas été poursuivie en CMF. La recherche de clonalité a mis en évidence un clone T majoritaire peu compatible avec une origine réactionnelle.

En septembre 2023, Mme G reconsultait pour le suivi de son hyperlymphocytose T monoclonale. Cliniquement, elle était toujours asymptomatique avec un taux stable en lymphocytes totaux (2.9 G/L) mais avec une légère augmentation du taux des lactates déshydrogénases. Cette fois-ci, un immunophénotypage lymphocytaire complet a été réalisé.

Matériels et Méthodes :

Un échantillon de sang total a été analysé sur le cytomètre semi-automatisé « AQUIOS CL » (Beckman Coulter) permettant la quantification des sous-populations lymphocytaires T, B et NK. Devant l'hypothèse d'une lymphoprolifération de type LGL, les marqueurs suivants ont été testés sur le cytomètre « DxFlex » (Beckman Coulter) : CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD10, CD16, CD25, CD26, CD56, CD57, KIR3DL2 (CD158k).

Résultats, Discussion et Conclusion :

L'immunophénotypage a mis en évidence une majoration de l'hyperlymphocytose T CD3+ CD4+ représentant 2312 cellules/ μ L. Cette hyperlymphocytose TCD4+ était constituée de 62 % de lymphocytes avec un profil LGL+ (CD57+). L'étude des marqueurs pan-T montrait diverses aberrations phénotypiques : une perte d'expression du CD7, une augmentation de l'intensité d'expression du CD2 et une diminution d'expression du CD5 par rapport aux lymphocytes T résiduels. En outre, on observait une perte du marqueur CD26 sans expression du KIR3DL2. Au total, on objectivait la présence d'arguments immunophénotypiques en faveur d'une leucémie à LGL-T CD4+ représentant ce jour 1433 cellules/ μ L. En effet, la majorité des leucémies à LGL-T sont de phénotype CD8+, toutefois de rares cas de cellules tumorales CD4+ ont été décrits. La majorité des patients atteints de ce sous-type de leucémie à LGL ne présentent ni neutropénie ni splénomégalie et sont associés à une fréquence élevée de mutations de STAT5B (55 % des cas). Cette prolifération semble liée à une stimulation par le cytomégalovirus. Phénotypiquement, ces proliférations sont caractérisées par une expression cytotoxique avec notamment un CD11c-, CD94- CD56+, CD57+, granzyme B+. En outre, ces cellules présentent un phénotype de cellule T activées avec une augmentation de l'expression du CD2, du CD22a, de l'HLA-Dr et une diminution d'expression du CD7.

Apport de l'analyse de vitré par cytométrie en flux pour le diagnostic de lymphomes oculo-cérébraux

S. Cointe^{1,2} (sylvie.cointe@univ-amu.fr), S. Fritz¹, A. Bonifay¹

¹ Service d'hématologie, secteur CMF, APHM, Biogénopole Timone, Marseille, France

² C2VN, Marseille, France

Le Lymphome oculo-cérébral (LOC) est lymphome non Hodgkinien rare affectant le compartiment intraoculaire et le système nerveux central. Le diagnostic du LOC est difficile en raison de la variabilité des manifestations cliniques et de la qualité et/ou du faible volume d'échantillon vitréen à analyser. Le diagnostic biologique repose sur des analyses spécialisées de cytologie et cytométrie de flux (CMF) sur LCR ou prélèvement vitréen pour mettre en évidence les cellules lymphomateuses. Un dosage d'interleukines (IL), permet d'évaluer le ratio IL10 /IL6 qui sera un argument indirect de lymphome. A l'heure actuelle, la démarche diagnostique de LOC reste encore à définir. Étude monocentrique rétrospective de janvier à juillet 2023 incluant 5 patients avec à leur admission un tableau clinique évocateur de LOC. L'analyse du prélèvement vitréen a été réalisé par cytologie, CMF et en immunologie (IL10 et IL6). Sur LCR, 2 patients sur 3 ont un dosage IL10/IL6>1, ce qui est en faveur d'un processus lymphomateux tandis que l'analyse cytologique et CMF (Cyto/CMF) ne permettent pas de mettre en évidence de cellules lymphomateuses. Sur le prélèvement oculaire la cytologie et la CMF sont pertinentes et sensibles puisqu'elles permettent de mettre en évidence les cellules lymphomateuses chez 75% des patients. La Cytologie/CMF est donc sensible pour le diagnostic des LOC sur prélèvement oculaire de même que le dosage IL qui est positif dans 3 cas sur 4.

Pour le LCR, la cytologie/CMF ne semblent pas avoir d'intérêt puisqu'aucun n'a conduit à la détection de cellules lymphomateuses. Cette absence de détection peut s'expliquer soit par la non-circulation de ces cellules ou bien par les contraintes pré-analytiques de l'analyse par CMF. A l'inverse, dans le vitrée, la cytologie/CMF ont permis la détection de cellules lymphomateuses chez 3 patients/4 montrant une sensibilité plus importante dans le vitré alors que les contraintes préanalytiques sont les mêmes que pour le LCR. Le dosage IL10/IL6 sur LCR semble avoir une bonne sensibilité (67%) mais il n'est pas suffisant car il reste un élément indirect du diagnostic. Dans le prélèvement oculaire, cette sensibilité atteint les 75% mais les réserves restent les mêmes que dans le LCR en raison de son caractère indirect et de son manque de spécificité. L'ensemble des examens biologiques disponibles actuellement peuvent être mis en échec. En effet, pour un patient, les examens de Cytologie/CMF et d'immunologie ont été retrouvés négatifs ce qui montre qu'un résultat biologique négatif ne permet pas d'exclure un LOC en cas de forte suspicion clinique. En conclusion, le diagnostic de LOC reste difficile et nécessite des prélèvements invasifs (vitrectomie...). Les analyses de cytologie/CMF et d'immunologie forment un faisceau d'arguments complémentaires mais ne suffisent pas dans certains cas. Dans ce contexte de cellules fragiles, des analyses sur ADN telles que la recherche de clonalité B ou T par biologie moléculaire, peuvent être envisagées pour compléter cette démarche diagnostique. Malgré un faible échantillonnage nos résultats montrent le rôle majeur de la CMF sur les prélèvements oculaires dans le diagnostic des LOC en mettant toutefois en avant l'importance du respect des conditions pré-analytiques.

Références :

1. Soussain.C. et al Blood.2021.
2. Bardet.V et al.GFHC.Revue de Biologie Médicale.2022.
3. Song.Y et al.Scientifreport.2016.
4. LegarfTarvernier.M et al Cythem.

Lymphoprolifération NK/T chez un patient CA-EBV

S. Cointe^{1,2} (sylvie.cointe@univ-amu.fr), S. Fritz¹, F. Politi¹, A. Bonifay¹

¹ Service d'hématologie, secteur CMF, APHM, Marseille, France

² C2VN - Équipe 3 microvesicules, Faculté de Pharmacie, Marseille, France

L'Epstein-Barr virus (EBV) est un virus à ADN ubiquitaire qui infecte plus de 95% de la population causant le plus souvent une infection asymptomatique ou un syndrome mononucléosique bénin. Dans de rares cas, une infection chronique appelée «Chronic Active Epstein Barr virus» (CA-EBV) peut survenir et se caractérise par une infection >3 mois avec les symptômes suivants: fièvre, hépatosplénomégalie, adénopathies, cytopénies, éruption cutanée, diarrhée et uvéite, sans déficit immunitaire connu. Un lien a été établi entre CA-EBV et lymphoprolifération. En Europe, il est décrit le plus souvent, une lymphoprolifération B suite à l'intégration de l'ADN viral dans les lymphocytes B. En Asie et Amérique Latine, ce sont des proliférations T ou NK qui sont décrites suite à l'intégration du virus dans des cellules hôtes inhabituelles les lymphocytes T ou NK. Le mécanisme et la physiopathologie restent encore indéterminés.

Présentation du cas : En 2017, le patient se présente aux urgences pour des douleurs abdominales fébriles. L'examen clinico-biologique retrouve des polyadénopathies profondes abdominales, associées à une pancytopenie, une atteinte hépatique et une élévation des LDH. Il présente également un antécédent d'infections ORL à répétition. Une biopsie ganglionnaire met en évidence un contingent de cellules lymphoïdes atypiques ainsi qu'une population lymphocytaire infectées par l'EBV (ARN EBERs+, LMP1+ et EBNA2-) avec un profil immunohistochimique d'infection de latence 2. Une PCR EBV sanguine retrouve 458 000 copies/ml. Le diagnostic de lymphome NK/T est évoqué ainsi qu'un probable déficit immunitaire qui n'a jamais été étiqueté. Cependant une évolution favorable spontanée remet le diagnostic en question. En 2022, le patient présente une récurrence d'un tableau clinique post-vaccination COVID avec une PCR EBV sanguine > 965 000 copies/ml. Le typage lymphocytaire TBNK sur sang et moelle révèle une lymphocytose NK (50% des lymphocytes). Une PCR EBV réalisée sur lymphocytes NK triés a montré des taux importants de copies d'EBV (6 600 000 copies/ml). Le diagnostic de lymphoprolifération NK CA-EBV induite compliquée d'un syndrome d'activation macrophagique est cette fois posé et traité par corticoïdes 60mg/J et ciclosporine jusqu'à obtention d'une bonne réponse clinique permettant l'arrêt total des immunosuppresseurs sans événements particulier durant plusieurs mois. En 2023, une nouvelle récurrence compliquée d'une perforation intestinale avec sepsis conduit le patient en réanimation. La lymphocytose NK a encore progressé : 78% des lymphocytes totaux soit 1,6G/L. Une biopsie tissulaire à la suite de cette perforation intestinale retrouve des lymphocytes T EBERs+. Le diagnostic de SAM réactionnel à une prolifération lymphocytaire T/NK induit par son CA-EBV est posé. Un traitement par étoposide et ruxolitinib est instauré. Une allogreffe avec son frère compatible est envisagée malheureusement, le patient décèdera 3 semaines après.

Il existe peu de cas décrits d'infections des cellules NK par l'EBV. Le mécanisme d'intégration du virus dans les lymphocytes NK n'est pas totalement élucidé cependant la charge virale élevée retrouvée au sein des lymphocytes NK ainsi que la détection de l'Ag EBER par cytométrie de flux dans les lymphocytes NK permettent d'établir un lien entre la lymphoprolifération et l'infection virale.

Références :

1. Yaxian et al.2023. BMC Infectious disease.
2. Shigeyoshi Fujiwara.Cancers.2020.
3. Kimura H.J Infect Dis.2003.

L'importance du CD103 dans le phénotypage T : Un lymphome T associé à une entéropathie révélé par l'immunophénotypage des cellules tumorales circulantes

L. Della Torre¹ (lucas.dellatorre@chu-guadeloupe.fr), L. Claude^{1,2}, D. Clavier³, P. Hélias³, V. Baccini^{1,2}

¹ Laboratoire d'Hématologie, CHU de la Guadeloupe, Pointe à Pitre, Guadeloupe

² UMR S_1134, Inserm, Pointe à Pitre, Guadeloupe

³ Département d'onco-hématologie, CHU de la Guadeloupe, Pointe à Pitre, Guadeloupe

Le lymphome à cellules T associé à une entéropathie (EATL) est une entité rare (< 5% des lymphomes T)^{1,2}. Il comprend deux formes : l'EATL de type I, connu sous le nom d'EATL, très souvent associé à la maladie coeliaque (CD) et plus fréquent dans les populations du nord de l'Europe et l'EATL de type II, appelé lymphome T intestinal épithéliotrope monomorphe (MEITL), non associé à la CD et plus fréquent dans les populations asiatiques et hispaniques.

La CD est une maladie auto-immune chronique de l'intestin grêle liée à une intolérance au gluten chez des patients génétiquement prédisposés³. La maladie coeliaque réfractaire (RCD) est une forme de CD caractérisée par une atrophie des villosités et une malabsorption malgré un régime strict sans gluten depuis plus d'un an⁴. Deux sous-types différents de RCD sont définis sur la population lymphoïde intraépithéliale. La RCD de type I se caractérise par un infiltrat lymphoïde intraépithélial de phénotype normal alors que la RCD de type II se caractérise par une expansion clonale de lymphocytes intraépithéliaux n'exprimant pas le CD3 en surface mais en intracellulaire et n'exprimant ni le CD8 ni le récepteur T (TCR). Cette RCD évolue fréquemment en EATL⁵.

Le diagnostic de certitude repose sur l'examen histologique d'une biopsie de la tumeur.

Nous présentons le cas d'un EATL avec dissémination sanguine, ce qui est exceptionnel.

Un homme de 64 ans a été admis à l'hôpital pour résection d'une masse intestinale envahissant la vessie et le sigmoïde. Lors d'une coloscopie réalisée deux ans auparavant pour une diarrhée chronique, un polype avait été réséqué et analysé. Ce polype était sans particularité ni infiltrat lymphoïde intraépithélial. L'analyse pathologique de la masse intestinale a conclu à une lymphoprolifération maligne sans diagnostic spécifique. Un mois après l'opération, le patient s'est aggravé. Son bilan biologique a révélé une anémie à 85 g/L et une lymphopénie à 0,3 G/L. Le reste du bilan montrait une CRP à 98,30 mg/L et une créatinine à 434 µmol/L. Au frottis sanguin, il a été observé quelques lymphocytes atypiques de taille variable, à noyau irrégulier et chromatine relativement fine avec quelques vacuoles dans le cytoplasme. La numération des globules blancs s'est majorée de 9 G/L à 61 G/L en une semaine, atteignant plus tard 184 G/L. L'immunophénotypage de ces cellules était le suivant : CD45+ fort, CD3+ (en intracytoplasmique mais pas en surface), CD4-, CD8-, CD5-, CD7+, CD56-, CD103+, CD30+. Ce phénotype est caractéristique de l'EATL. L'histopathologie de la résection chirurgicale a confirmé ce diagnostic. Une aspiration de moelle osseuse a été réalisée et a montré 82% de lymphocytes avec une morphologie similaire. L'élément surprenant dans ce cas est l'absence d'entéropathie préexistante et la diffusion sanguine rapide du lymphome. L'invasion de la moelle osseuse est possible mais peu fréquente dans les EATL. Malheureusement, malgré l'introduction d'une corticothérapie, qui a permis la réduction de la lymphocytose mais provoqué une aggravation ultérieure du syndrome de lyse, le patient est décédé quelques jours plus tard.

Références :

1. Delabie J., 2011, Blood, 118 (1): 14855.
2. Vose J., 2008, Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 26 (25): 412430.
3. Nijeboer P., 2015, American Journal of Hematology, 90 (6): 49398.
4. Hujoel I.A., 2020, Current Gastroenterology Reports, 22 (4): 18.
5. Biagi f., 2010, Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 7 (3): 15862.

Les néoplasies lymphoïdes matures B CD5 négatives : Confrontation cytométrie en flux-cytologie

A. Mahmoud¹ (jmilineja@yahoo.fr), L. Mohamed¹, H. Ben Cheikh¹, W. Maatamri¹, N. Ben Sayed², N. Jmili Braham¹

¹ Laboratoire d'Hématologie, CHU Farhat Hached De Sousse, Sousse, Tunisie

² Service d'Hématologie Clinique, CHU Farhat Hached De Sousse, Sousse, Tunisie

Introduction et Objectifs :

L'immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux (CMF) est la méthode de référence pour le diagnostic différentiel des néoplasies lymphoïdes matures (NLM). Notre travail a eu pour but de confronter les données cytométriques à l'aspect cytologique des cellules lymphoïdes sanguines pour un diagnostic différentiel des NLM de type B CD5 négatives.

Matériel et Méthodes :

Il s'agit d'une étude rétrospective effectuée au Laboratoire d'Hématologie du CHU Farhat Hached de Sousse (TUNISIE), incluant tous les patients ayant une hyperlymphocytose depuis plus de 2 mois et un immunophénotype lymphocytaire CD19+ et CD5- sur une période s'étalant du 1er janvier 2019 au 31 août 2023. L'analyse des données a été réalisée grâce au logiciel SPSS 21.

Résultats :

Sur 213 patients pour lesquels un immunophénotypage par CMF (Panel : CD19, CD5, CD23, FMC7, CD22, CD20, CD79b, CD10, CD103, CD43, CD38, CD25, CD11c, CD2, CD3, Kappa, Lambda), était effectué : 12,2% soit 26 patients avaient un phénotype CD19 + et CD5 – avec un sex-ratio (H/F) de 1,33. L'âge médian était de 62 ans [36 – 84]. Au moment de l'analyse, 54% des patients avaient une splénomégalie et/ou des adénopathies et tous les patients avaient une hyperlymphocytose (moyenne : 44178/mm³). L'examen du frottis sanguin avait révélé la présence de lymphocytes atypiques chez 21 patients (lymphocytes villeux : 6 cas, tricholeucocytes : 5 cas, prolymphocytes (>55%) : 1 cas, lymphocytes rappelant le lymphome folliculaire ou le lymphome de manteau : 3 cas, lymphocytes à cytoplasme étendu hyperbasophile ou sans spécificité : dans les autres cas). Le profil phénotypique était en faveur du lymphome de la zone marginale (LSZM) dans 50% des cas, caractéristique de la leucémie à tricholeucocytes chez 4 patients (caractérisés par la positivité du CD103, CD11c et CD25) et de la leucémie à tricholeucocytes variante dans un seul cas (caractérisé par la positivité de CD103 et CD11c et la négativité de la CD25) et était compatible avec une leucémie prolymphocytaire chez un patient. Le score de Matutes était =3 dans un seul cas et < 3 dans 25 cas (96%) (dont 0 (dans 7 cas), 1 (dans 14 cas), 2 (dans 4 cas)).

Conclusion :

Bien que le diagnostic fût établi pour la majorité des patients, des examens complémentaires tels que la biologie moléculaire étaient nécessaires pour d'autres comme le lymphome folliculaire et les lymphomes de la zone marginale qui étaient évoqués mais non confirmés.

Références :

1. Aussedat G et al. Ann Biol Clin (Paris). 2022 Mar 1;80(2):157-168.
2. Debord C et al. Int J Lab Hematol. 2020 Jun;42 Suppl 1:113-120.
3. De Tute RM. Histopathology. 2011 Jan;58(1):90-105.

Étude des lymphocytes T CD4+/CD8+ au cours de l'infection par le VIH par cytométrie en flux : expérience monocentrique en Tunisie

R. Mezrigui¹ (rihem_mez@yahoo.fr), S. Chouchene¹, R. Elaïssi¹, W. Marrakchi², A. Ben Abdallah³, A. Chammakhi³, N. Hedheli³, M. Chakroun², M. Hassine¹

¹ Laboratoire d'hématologie, CHU FB Monastir, Monastir, Tunisie

² Service des maladies infectieuses, CHU FB Monastir, Monastir, Tunisie

³ Université de Monastir, Faculté de pharmacie de Monastir, Monastir, Tunisie

Introduction et Objectifs :

Les protocoles de la numération lymphocytaire par cytométrie en flux sont toujours en évolution grâce au progrès technologique. L'objectif de notre travail est d'optimiser et valider un protocole d'analyse par cytométrie en flux permettant l'évaluation des lymphocytes T durant l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Matériels et Méthodes :

Il s'agit d'une étude prospective d'une série de patients vivants avec le VIH (PVVIH), suivis au service des maladies infectieuses de l'hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir, durant 17 mois. L'analyse des échantillons a été réalisée par un cytomètre à flux Attune™ NxT (ThermoFisher Scientific®) en optant pour un marquage quadruple sans lyse (CD45-PerCP, CD3-APC, CD4-FITC et CD8-PE). Une étape d'optimisation du protocole était menée pour valider le choix de la concentration des anticorps, la prise d'essai, la température et la durée de conservation des échantillons. Les données obtenues ont été analysées moyennant le logiciel SPSS version 26.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Au total, 288 patients ont été colligés. L'âge médian était de 38 ans [19 – 71 ans]. Une prédominance masculine (78%) est notée avec une sex-ratio 2,69. Un protocole d'analyse a été établi tenant compte des résultats de l'optimisation, puis validé sur une série des patients. Le taux médian des lymphocytes était de 2,08 G/L [0,07 – 6,31 G/L]. Dans notre série, 19,1% (N=55) des patients avaient une lymphopénie dont 31 avaient une lymphopénie sévère (< 1 G/L). L'analyse des échantillons par cytométrie en flux a montré que presque 50% des patients avaient des taux normaux de CD3 et de CD4. La médiane des taux de CD4 était de 0,55 G/L [0,003 – 2,31 G/L]. Le risque des infections opportunistes majeures avec CD4 < 200/mm³ était présent chez 10% des cas alors que 15,6 % des valeurs trouvées avaient montré un risque de développement des infections opportunistes mineures (CD4 entre 200 et 350/mm³). Un léger déficit immunitaire (CD4 entre 350 et 500/mm³) était trouvé chez 58 patients. Par contre, la moitié des valeurs étaient supérieures à la normale pour les CD8. Le ratio CD4/CD8 avait une médiane de 0,63 [0,03 ; 3,01]. Il était inférieur à un chez 75% des cas (N=216). Au cours de la maladie de VIH, les cellules CD4 diminuent alors que les cellules CD8 circulantes augmentent généralement en réponse à l'infection. Cette augmentation entraîne un faible rapport CD4/CD8. Après avoir reçu un traitement antirétroviral, certains patients restaureront leur nombre de CD4 et connaîtront une baisse du nombre de CD8, ce qui aboutira à une normalisation du rapport. Pour d'autres PVVIH, malgré la suppression du virus et l'amélioration des taux de CD4, les taux de CD8 restent élevés et leur ratio ne s'améliore pas (1). En fait, nos résultats rejoignent ceux trouvés par plusieurs études réalisées sur la normalisation du ratio CD4/CD8, prouvant que seule une minorité de personnes infectées par le VIH-1 sous traitement ARV normalisent leur rapport CD4/CD8 (2-5).

Références :

1. Tinago W et al. Clinical, immunological and treatment-related factors associated with normalised CD4+/CD8+ T-Cell Ratio: Effect of naïve and memory T-Cell subsets. PLoS ONE. 2014;9(5):e97011.
2. Mussini C, et al. CD4/CD8 ratio normalisation and non-AIDS-related events in individuals with HIV who achieve viral load suppression with antiretroviral therapy: An observational cohort study. Lancet HIV. 2015;2(3):98106.
3. Davy-Mendez T et al. Acute HIV infection and CD4/CD8 ratio normalization after antiretroviral therapy initiation. J Acquir Immune Defic Syndr. 2018;79(4):5108.
4. Sauter R et al. CD4/CD8 ratio and CD8 counts predict CD4 response in HIV-1-infected drug naïve and in patients on cART. Medicine. 2016;95(42):1-8.
5. Vivancos-Gallego MJ et al. CD4+ : CD8+ T-cell ratio changes in people with HIV receiving antiretroviral treatment. Antiviral Ther. 2020;25(2):91100.

Étude de la stabilité des échantillons destinés à l'estimation des sous-populations lymphocytaires T par cytométrie en flux

R. Mezrigui¹ (rihem_mez@yahoo.fr), A. Chammakhi², N. Sayeh², S. Chouchene¹, R. Elaissi¹, M. Hassine¹

¹ Laboratoire d'hématologie, CHU FB Monastir, Monastir, Tunisie

² Université de Monastir, Faculté de pharmacie de Monastir, Monastir, Tunisie

Introduction et Objectifs :

La détermination de sous-populations lymphocytaires par cytométrie en flux semble être dépendante de certains facteurs biologiques et techniques, parmi lesquels, le temps de stockage et la température auxquels l'échantillon est maintenu avant et après marquage. L'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet du stockage sur les estimations des sous-populations lymphocytaires T par cytométrie en flux.

Matériels et Méthodes :

Il s'agit d'une étude prospective qui a inclut deux séries des échantillons de sang total prélevé sur EDTA des sujets sains à l'hôpital Fattouma Bourguiba de Monastir (N=12). Une série était conservée à 4°C et l'autre à 22°C avant et après marquage par des anticorps monoclonaux marqués (antiCD3-APC, antiCD4-FITC et antiCD8-PE). Le protocole utilisé était basé sur la méthode de lyse sans lavage et sans centrifugation. Les échantillons étaient ensuite analysés par le cytomètre Attune NxT (ThermoFisher®) à 1h, 24h et 48h après prélèvement. Les données étaient analysées par SPSS 26 en utilisant le test T-Student pour échantillons appariés. Le seuil de significativité (p) était fixé à 0,05.

Résultats, Discussion et Conclusion :

La comparaison des moyennes par le test T-Student a montré que la conservation des échantillons des LT marqués dans leurs tubes d'analyse à +4°C a entraîné une diminution notable des pourcentages des LT CD3+, CD4+ et CD8+ ($p < 0,05$). Cette diminution était plus marquée après 48h de stockage.

Par ailleurs, l'analyse des échantillons conservés à +4°C sans marquage n'a pas montré de différence significative entre les pourcentages de LT CD3+ et CD4+ à 24h (CD3+ $p=0,093$, CD4+ $p=0,07$) et à 48h (CD3+ $p=0,124$, CD4+ $p=0,809$). Cependant, la différence était significative à +4°C après 24h et 48h pour les LT CD8+ ($p < 0,05$).

De plus, la comparaison des moyennes par le test T-Student a montré que la conservation des échantillons des LT marqués dans leurs tubes d'analyse à +22°C a entraîné également une diminution notable des pourcentages des LT CD3+, CD4+ et CD8+ ($p < 0,05$).

L'analyse des échantillons conservés sans marquage à +22°C n'a pas montré de différence significative que pour les LT CD4+ après 48h de conservation ($p=0,007$).

Au final, pour une analyse différée des sous-populations lymphocytaires T par Attune NxT®, en utilisant une méthode sans centrifugation, une conservation des échantillons à 22°C sans marquage cellulaire pendant 24h garantit l'obtention des résultats fiables.

Profil immunophénotypique des Leucémies Lymphoïdes Chroniques par cytométrie en flux

S. Oukid (oukids2020@gmail.com), S. Taoussi, H. Brahimi, F. Lamraoui, N. Rekab, K. M. Benlabiod, Y. Moussa Bouchakor, M. Mezroud, C. Boucherit, C. Guezlane, A. A. Ziani, Z. Ferdi, A. Rebouh, Z. Bouchetara, M. T. Abad, M. Bradai

Laboratoire de recherche sur les Hémopathies Malignes et les Hémoglobinopathies, Service Hématologie, EHS ELCC, Faculté de Médecine, Université, Blida, Algérie

Introduction :

Nous rapportons le profil phénotypique de **583** cas de Leucémies Lymphoïdes Chroniques (LLC) diagnostiquées par cytométrie en flux (CMF) de Janvier 2007 à Juillet 2023.

But :

Déterminer le score de Matutes et le profil phénotypique des LLC.

Matériels et Méthodes :

Pour chaque patient présentant une hyperlymphocytose, un prélèvement sanguin sur EDTA est évalué en CMF en utilisant un panel d'AC monoclonaux ciblant les populations lymphoïdes B, T et NK. Les résultats sont exprimés en pourcentage et intensité de positivité des marqueurs monoclonaux.

Résultats :

Il s'agit de 167 femmes et 416 hommes ; sex-ratio = 2,49 ; âge moyen = 66.34 ans (35-96).

Taux moyen de GB=93515/ μ l (9000-922 400). L'analyse cytologique : LLC : 377 cas (64.7%) et un autre syndrome lymphoprolifératif chronique : 206 cas (35.3%).

Profil phénotypique par CMF :

Score de Matutes : 3 = 77pts (13.3%), 4 = 216pts (37%) et 5 = 290pts (49.7%).

Expression positif: CD5 : 100%, CD23 : 99.8%

FMC7 : non exprimé : 83%

CD79b : non exprimé ou faiblement exprimé : 63%

Monoclonalité analysée dans 517 cas: Kappa : 280 (54.2%), Lambda : 134 (25.9%), non exprimée : 103 (19.9%)

CD20 analysé dans 494 cas exprimé fortement dans 35.4% (175 cas)

CD38 analysé dans 525 cas, positif: 239cas (45.5%)

CD200 analysé dans 122cas: positif dans 99.2%

Commentaires :

Dans notre étude, le score de Matutes est ≥ 4 dans 86.9% rejoint celle de T.Dragovic(1), qui a analysée 180cas: 85% ; de N.Guillaume(3) qui a analysée 79cas : 91% et dans une étude Algérienne de 52cas : 75%.(2)

Dans notre étude, le score 3 est de 13.3%; vs 14% l'étude de Dragovic vs 6% dans l'étude de Guillaume et vs 25% dans l'étude Algérienne.

Dans notre étude l'expression du CD5, CD23 et FMC7 rejoint celle de l'étude Algérienne (CD5 et CD23 à 100% et FMC7 exprimé à 38%). Dans l'étude de Dragovic, le CD5, le CD23 sont exprimés dans 99% des cas ; le FMC7 dans 8% et le CD79b dans 57% ; dans l'étude de N. Guillaume, le CD5 est exprimé a 92% des cas, CD23 dans 96%, CD79b dans 52% et le FMC est négatif dans 78%.

Dans notre étude, l'expression de la chaîne Kappa rejoint l'étude de Dragovic à 57% vs 71% dans une étude Algérienne.

Dans notre étude, le CD38 est exprimé à 45.5% des cas ; il est positif dans 14 cas (27%) dans l'étude Algérienne et il est positif dans 32% des cas dans l'étude de Dragovic.

Dans notre étude le CD20 est exprimé fortement dans 35.4%; vs 9% dans l'étude de Dragovic vs 19% dans l'étude de Guillaume.

Conclusion :

La CMF est un outil essentiel pour le diagnostic des LLC. Dans notre étude le diagnostic de LLC a été retenu dans 86.9% selon le score de Matutes ≥ 4 en corrélation avec les données de la littérature. Pour le score est égale à 3 d'autres investigations ont permis de retenir le diagnostic telle que la cytogénétique. Ainsi l'immunophénotypage par cytométrie de flux doit être systématique devant toute hyperlymphocytose persistante.

... / ...

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies lymphoïdes

... / ...

Références :

1. Tijana Dragović Ivančević¹ et al. The Role of Immunophenotyping in Differential Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia. Mars 2014.
2. SE. Belakehal. Apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic et la classification des lymphomes. Thèse pour l'obtention de Doctorat en Sciences Médicales. 2008.
3. N. Guillaume. Pertinence des analyses cytologiques et immunophénotypiques dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique B Volume 60, numéro 6, Novembre - Décembre 2002.

Expression des marqueurs aberrants au cours des leucémies aiguës en pédiatrie analysées par cytométrie de flux

N. E. H. Toumi¹ (prnourelhouda@gmail.com), H. Jouini¹, H. Zarrouk¹, M. Ouderni²

¹ Laboratoire hématologie, Hôpital d'enfants Béchir Hamza de Tunis, Tunis, Tunisie

² Service de Pédiatrie Immuno-Hématologie et Greffe de Cellules Souches, Centre national de greffe de moelle osseuse, Tunis, Tunisie

Introduction :

La cytométrie de flux (CMF) est un outil de diagnostic essentiel dans les leucémies aiguës, utilisant des panels pour l'assignation de lignée permettant de guider les choix thérapeutiques. Il permet également l'identification des aberrations immunophénotypiques.

L'objectif de cette étude est d'identifier les marqueurs aberrants ainsi que leurs fréquences au cours des LA.

Matériel et Méthodes :

Étude rétrospective menée sur une période de 8 ans (2015-2023) concernant 125 cas de LA pédiatriques diagnostiqués au laboratoire d'Hématologie de l'hôpital d'enfants Bechir Hamza de Tunis (HEBHT). L'IP a été effectué sur des échantillons de moelle osseuse prélevés sur tube EDTA (cytomètres Beckman Coulter Navios® et BD FACLyrics). La classification immunophénotypique des LA a été établie selon les critères d'EGIL (European Group of Immunological Leukemia).

Résultats et Discussion :

125 patients : âge moyen : 2.7 ans - Sexe ratio : 1.65 (78/47).

Les LA ont été réparties comme suit : LAM 41 cas (32.8%), LALB 71 cas (56.8%), LALT 10 cas (8%), LA de phénotype mixte 3 cas (2.4%). Ces résultats concordent avec la littérature, en effet les LAL sont les plus fréquentes en pédiatrie. Une expression de marqueurs aberrants a été observée dans 38 cas (30.4 %).

Le marqueur aberrant le plus exprimé au cours des LAM est le CD56, en accord avec d'autres études. Le CD7, le CD20 et le CD4 ont été également retrouvés. Pour les LALB, les marqueurs identifiés sont par ordre de fréquence le CD33, le CD117 et le CD7. Nos résultats sont concordants avec la littérature.

Concernant les LALT, seul le marqueur lymphoïde B CD10 a été retrouvé.

Conclusion :

L'IP représente un examen clé pour le diagnostic et la classification des LA, permettant une prise en charge adéquate et adaptée à chaque type. Les phénotypes aberrants sont utiles dans l'évaluation du pronostic et le suivi de la maladie résiduelle.

Enjeux éthiques et sociétaux de la responsabilité environnementale de la recherche

E. Rial-Sebbag (emmanuelle.rial@univ-tlse3.fr)

CERPOP, Inserm, Toulouse, France

La responsabilité environnementale implique que le développement des activités humaines tienne compte de leur impact sur notre environnement. Les activités de recherche n'échappent pas à cette exigence et se doivent de concilier les ambitions d'une recherche innovante avec les enjeux de protection de la nature et de l'humanité. Afin de guider les chercheurs et leurs institutions dans la conduite de leurs projets et également de stimuler de nouveaux sujets de recherche, des points de vigilance ont été identifiés par plusieurs organisations internationales (ONU, UNESCO), des règles ont été élaborées en France notamment par l'adoption de Lois et des outils sont développés par les chercheurs eux-mêmes. Nous présenterons ce cadre de réflexion et les enjeux à venir tant pour l'éthique de la recherche que pour leur gouvernance.

Références :

1. ONU, Objectifs de développement durable, 1995.
2. UNESCO, Déclaration de principes éthiques en rapport avec le changement climatique, 2017.

Labo 1.5 / Biosécurité / Environnement / Développement durable

Labos 1point5 et partage d'expérience d'un laboratoire en transition

M. Andrieu¹ (muriel.andrieu@inserm.fr), M.-L. Parmentier²

¹ INSTITUT COCHIN, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Cité, Paris, France

² INSERM, Montpellier, France

La première partie de cet exposé sera une présentation des résultats du questionnaire qui vous a été proposé en tant que collègues cytométristes présents à ce congrès AFC 2023 sur vos ressentis sur les enjeux environnementaux actuels. Nous vous invitons à participer si vous ne l'avez pas encore fait : https://webquest.fr/?m=213140_cytometrie-et-transition-questionnaire-en-amont-de-la-presentation-labo-15-retour-dun-laboratoire-en-transition-ml-parmentier-et-m-andrieu

Nous verrons ensuite comment sont pris en compte les enjeux environnementaux au niveau de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de nos tutelles, puis à l'échelle des laboratoires de recherche, et des plateformes. Des exemples d'actions possibles dans les laboratoires inspirés de mon expérience seront présentés, mais également des idées d'actions émanant de vos retours dans le questionnaire.

La dernière partie sera consacrée à la présentation de Labos1point5 et des outils qu'ils proposent, nous verrons en quoi ils peuvent concrètement vous aider à engager vos laboratoires dans la transition (réalisation de bilan carbone, réseau des laboratoires en transition ...).

Références :

1. <https://labos1point5.org>

Retour et perspectives du groupe Biosécurité et environnement de l'AFC

E. Näser (emmanuelle.naser@ipbs.fr)

PF Cytométrie, IPBS, Toulouse, France

Un retour sur les actions du groupe sur 2023 vous sera présenté.

Nous aborderons l'axe biosecurité avec l'étude du risque sur la partie pré-analytique des échantillons analysés pas Cytométrie en flux. La Clinique et la R&D : 2 types de laboratoire avec des échantillons similaires et des pratiques différentes.

Puis nous aboerond l'axe environmental avec la présentation des résultats du questionnaire à destination de nos fournisseurs sur les axes consommables, équipement, politique de traitement des déchets électroniques, durée de vie et continuité des contrats. L'objectif etant de sensibiliser les fournisseurs, puis d'inclure l'axe environnemental dans le choix de nos futurs équipements.

Puis nous vous présenterons les persepectives du groupe pour 2024.

Characterizing metabolic intratumoral heterogeneity using mass cytometry

L. Stuaní^{1,2} (lucille.stuaní@inserm.fr), A. Jager³, A. Koladiya³, A. Sahal^{4,5}, J.-E. Sarry^{4,5}, K. L. Davis³

¹ *Équipe Oncogénèse Moléculaire, IRCM, INSERM U1194, Université de Montpellier, Montpellier, France*

² *Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM), Montpellier, France*

³ *Bass Center for Childhood Cancer and Blood Disorders, Department of Pediatrics, Stanford University, Stanford, CA, États-Unis*

⁴ *Équipe Métabolisme Et Résistance Thérapeutique dans les LAM, CRCT, INSERM UMR1037, CNRS 5071, Université de Toulouse, Toulouse, France*

⁵ *Department of Hematology, Toulouse University Hospital, Toulouse University Cancer Institute Oncopole, Toulouse, France*

Acute myeloid leukemia (AML) is among the deadliest blood cancers, with over 43,000 patients dying annually in Europe. Despite high rates of complete remission following conventional frontline genotoxic chemotherapy, patient prognosis remains poor with a 5-year overall survival of only 28%, which is largely attributable to frequent relapses. AML chemotherapy has seen minimal progress in four decades. However, the past decade witnessed approval of new drugs, including venetoclax (VEN), a selective inhibitor of the anti-apoptotic protein BCL2. Combining VEN with the hypomethylating agent azacytidine (AZA) or low-dose cytarabine (AraC) has yielded promising results, leading to the approval of these combinations. Nevertheless, achieving lasting responses remains challenging due to the emergence of resistance.

Metabolic flexibility and intratumoral heterogeneity, both genetic and non-genetic, play pivotal roles in resistance. Resistance to VEN-based therapies has implicated alternative anti-apoptotic proteins such as MCL1, the monocytic differentiation state, and the remodeling of mitochondrial electron transport chain complex I. TP53 or RAS mutations are also associated with resistance.

To gain insights into the interplay between differentiation state, metabolism, and signaling pathways in resistance to VEN-based therapies, we analyzed 36 primary AML samples (31 adult, 5 pediatric) using single-cell proteomics by mass cytometry, following *ex vivo* treatment with VEN, AraC, AZA, VEN+AraC, and VEN+AZA. Across two antibody panels, we measured myeloid phenotypic markers, key signaling pathways, transcription factors, and metabolic proteins relevant to glycolysis, the TCA cycle, fatty acid oxidation, amino acid transport, and mitochondrial dynamics, encompassing a total of 76 unique markers.

Cluster analysis using only the metabolic markers unveiled significant metabolic heterogeneity in AML. Importantly, the distribution of the clusters in each patient highlighted that, while there is indeed heterogeneity in cluster abundance between patients, most clusters are shared among nearly all patients. This underscores the value of this metabolic clustering approach in capturing metabolic heterogeneity across our cohort.

Moreover, by calculating pathway scores instead of examining individual markers, we observed that metabolic heterogeneity is associated with phenotypic state, albeit to a certain extent. This reaffirms the utility of evaluating metabolism alongside phenotype as a means to address intratumoral heterogeneity in AML patients.

As expected, *ex vivo* treatment with VEN eradicates more immature subpopulations while sparing monocytic populations. However, the use of phenotypic proteins alone to define populations fails to adequately identify persistent and emerging populations post-VEN treatments. Instead, clustering based on metabolic pathways proves effective.

Furthermore, we noted that the only shared clusters between adult and pediatric samples are those with the highest stemness score. Importantly, other stem-like clusters were specific to either adults or pediatrics, revealing relationships between immature markers and different anti-apoptotic proteins depending on the patient's age. Metabolic dependencies in pediatric AML is mostly unexplored, and VEN is an emerging therapy in this patient group.

Altogether, our data indicate that single-cell metabolic analysis using mass cytometry may offer a more comprehensive understanding of intratumoral heterogeneity in AML and enables discovery of pathways defining resistance or persistence to VEN-based therapies. Ongoing efforts include functional analyses and integrating clinical data, particularly mutational patterns.

Rôle de la microcirculation des dépôts adipeux dans l'adaptation aux transitions énergétiques

A. Briot (anais.briot@inserm.fr)

I2MC, Équipe DINAMIX, Inserm, Université de Toulouse, UMR1297, Toulouse, France

Introduction :

L'inflexibilité métabolique, commune à l'obésité et au vieillissement, est associée à la progression du diabète de type 2 et des désordres cardiovasculaires associés. L'altération de la capacité des tissus adipeux à réguler le turnover des lipides (stockage versus mobilisation) pourrait être causale, mais les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués restent à être précisés. Les cellules endothéliales jouent un rôle prépondérant dans la régulation des flux lipidiques selon des mécanismes dépendants du lit vasculaire (1). Dans le tissu adipeux les cellules endothéliales ont la particularité d'être en contact avec des flux importants et bidirectionnels d'acides gras qui doivent être stockés en période postprandiale ou acheminés vers la circulation sanguine en période de jeûne. Nos travaux visent à élucider les mécanismes mis en place au niveau de la microcirculation des dépôts adipeux et à identifier les altérations associées à l'inflexibilité métabolique.

Matériels et Méthodes :

Nos travaux reposent sur l'étude et la manipulation de cellules endothéliales natives et primaires immunosélectionnées à partir de tissus adipeux humains (CD45neg/CD31pos/CD34pos) et murins (CD45neg/CD31pos/SCA1pos). Le phénotype et la fonctionnalité des cellules endothéliales sont analysés en combinant des approches de cytométrie en flux, d'imagerie et d'explorations transcriptionnelles. Pour étudier et décrypter les mécanismes de prise en charge des acides gras à chaîne longue, nous avons mis en place des mesures de cinétique d'incorporation par cytométrie en flux et imagerie sur cellules vivantes (Incucyte®). En parallèle nous avons adapté, par cytométrie en flux, la mesure de l'activité bêta-galactosidase associée à la sénescence pour évaluer le vieillissement cellulaire ex vivo et in vitro.

Résultats et Conclusion :

Nos données soutiennent l'hypothèse selon laquelle les cellules endothéliales microvasculaires des tissus adipeux jouent un rôle central dans la flexibilité métabolique via leur capacité de gestion des flux lipidiques en fonction de l'état énergétique (2) (nourri versus à jeun) et que cette fonction serait une cible du vieillissement cellulaire (2,3) (sénescence).

Références :

1. Pi, X et al., *Circ Res.* 2018 Aug 3;123(4):477-494.
2. Aupetit et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023 May;43(5):684-696.
3. Briot et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 May;38(5):1134-1146.

Investigating the metabolic profile of immune and non-immune cells in solid tumor by imaging mass cytometry

H.-A. Michaud^{1,2} (henri-alexandre.michaud@inserm.fr), L.-A. Chèpeaux^{1,2}, P. Dupré³, Y. Glasson^{1,2}, N. Bonnefoy^{1,2}, L. Le Cam³, M. Lacroix³

¹ *Immunité et Cancer, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France*

² *Plateforme de Cytométrie et d'Imagerie de Masse, Institut régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France*

³ *Molecular Oncogenesis, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France*

Intratumoral heterogeneity (ITH) is known to be involved in both tumor progression and resistance to treatment. ITH is the result of strong selection pressure exerted by tumor location, immune and non-immune cell composition, and also by conventional treatments such as chemotherapy, radiotherapy or targeted therapies selecting new tumor clones, resistant or endowed with migratory capacities.

Metabolism has also been described as a significant contributor to ITH and tumor evolution [Hensley CT., Cell 2016]. Among the multiple metabolic pathways, it is known that pyruvate metabolism, which stands at the crossroads of glycolysis and oxidative phosphorylation (oxphos), is strongly altered in most tumor cells (Warburg effect). More recently, it has been shown that changes in pyruvate metabolism are involved in immunosuppression, tumor aggressiveness and response to treatment [1,3], in part through increased lactate secretion. In addition, tumor cells rewire pyruvate metabolism of CD8+ T lymphocytes, disrupting their anti-tumor effector functions and promoting tumor progression [2]. Hence, tumor metabolism has become a credible therapeutic prospect but significant efforts are needed to understand the multiple mechanisms by which metabolic changes contribute to the tumor heterogeneity at the single-cell level. Our main objective is to develop innovative approaches to decipher the molecular consequences and clinical relevance of these metabolic changes.

We optimized an imaging mass cytometry (IMC) approach to further understand the spatial distribution of metabolic enzymes in solid cancers. To demonstrate the relevance of this approach, we developed a panel of 35 antibodies to identify the major populations of tumor immunity (B and T lymphocytes, macrophages), stroma (vessels, fibroblasts) and tumor cells. We included key enzymes and metabolite transporters involved in glucose/pyruvate/fatty acid metabolism (Glut-1, HK2, PKM2, GPT2, ME1, ME2, MPC1, MPC2, LDHA, LDHB, MCT1, MCT4, CD36, CPT1a,), as well as hypoxia (CA9) and mitochondrial (ATP5a) markers. We also added the H3K18AC, an epigenetic marker associated to cancer progression. Using these markers, we were able to demonstrate a high degree of metabolic heterogeneity at different scales, at the tissular and the single-cell levels, as well as differences between tumor tissue and normal tissue.

Beyond tumor cells, we demonstrated a high degree of metabolic heterogeneity in immune cells, and the specific expression pattern of metabolic enzymes which discriminate tertiary lymphoid structures from Peyer's patches.

Our preliminary results validate IMC technology for a broad and deep understanding of solid tumor heterogeneity from a metabolic point of view. They revealed atypical expression profiles that may differ for a given cell type depending on its localization or interactions. These results pave the way for broader studies of solid tumors by IMC aiming at further understanding the role of metabolism, and its associated epigenetic changes in cancer progression. Combining IMC with complementary OMICs approaches, including spatial transcriptomic, is our next objective.

Références :

1. Vitale I., Nat Med 2021.
2. Elia I., Cell Metab 2022.
3. Hoang-Minh LB., EMBO 2018.

Single-Cell Metabolic Analysis in Leukemia by Mass-cytometry

Y. Simoni¹ (yannick.simoni@inserm.fr), B. Leadford², A. Monteiro², L. Aziez², E. Popova², D. Bouscary², M. Fontenay², A. Lehuen², N. Chapuis²

¹ *Hématopoïèse normale et pathologique, Institut Cochin, Paris, France*

² *Institut Cochin, Paris, France*

Metabolism is an important area of study in immunity as it underlies the fate and function of cells. Unique metabolic characteristics have been found between different immune cell types and states of activation however, immunometabolism is a complex study and is not completely understood. Metabolic targeting techniques show great therapeutic promise in immunotherapies. This can be particularly interesting in T cells as they are a powerful cell population central to adaptive immunity and have a variety of sub-populations with varying functions. The objective of this study is, therefore, to develop an assay analyze the metabolism of T cells on a single-cell level.

To this end, a panel was developed including 24 surface markers to identify cell sub-populations and 19 metabolic markers indicative of the activity of multiple metabolic pathways. Cytometry by Time of Flight was used to perform single-cell analysis.

Our preliminary results from healthy donor PBMC showed that the assay and panel were successful in single-cell metabolic analysis between immune cell sub-populations and notably phosphorylated proteins. Finally, the panel was tested on cancerous samples of patients with acute myeloid leukemia and preliminary results found that the assay is capable of finding distinct cell cluster of leukemic blast cells with differing metabolic profiles.

Effets d'une supplémentation en extrait de plante sur le métabolisme mammaire de la vache laitière observés sur cellules isolées du lait par cytométrie en flux

P. Poton¹ (perrine.poton@inrae.fr), L. Nicolas¹, F. Robert², P. Roussel¹, M. Boutinaud¹

¹ UMR PEGASE, INRAE Institut Agro Rennes Angers, Saint Gilles, France

² CCPA Groupe Deltavit, Janze, France

Introduction et Objectifs :

Le lait contient majoritairement des leucocytes mais également des cellules épithéliales mammaires (CEM) exfoliées au cours de la lactation. Les CEMs sont responsables de la synthèse du lait. La présence de ces cellules dans le lait permet d'accéder à du matériel biologique de manière non invasive. Nos premiers travaux ont montré que les CEMs isolées du lait permettent l'étude du métabolisme mammaire (1, 2). La vache laitière subit un stress oxydant au début de la lactation perturbant leur métabolisme et la synthèse du lait. Une supplémentation en antioxydants, en particulier avec la plante *Scutellaria baicalensis* (SB), pourrait limiter ce stress oxydant (3). Cette étude vise à observer les effets d'une supplémentation en SB chez les vaches laitières sur la viabilité des CEMs isolées du lait dans le but de comprendre l'effet de SB sur le métabolisme mammaire.

Matériels et Méthodes :

Des vaches ont reçu un régime alimentaire supplémenté (n = 8) ou non (vaches témoins n = 11) avec 1 g/j de SB au cours des 150 premiers jours de lactation. Des échantillons de lait (1,8 kg) ont été prélevés à j30, j50, j130 et j150 afin d'isoler les cellules du lait et de purifier les CEMs par une méthode de séparation immunomagnétique. Les CEMs ont été ensuite analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un kit d'apoptose (Annexine V et IP). Cette analyse permet d'identifier les différents statuts cellulaires (vivantes, en voie d'apoptose, en apoptose, en nécrose).

Résultats, Discussion et Conclusion :

La supplémentation en SB des vaches laitières a modifié le statut cellulaire des CEMs isolées du lait au cours des 150 premiers jours de lactation. En effet, le pourcentage de CEM en voie d'apoptose a eu tendance à diminuer à j50 (p = 0,08) chez les vaches supplémentées par rapport aux vaches témoins. De même le pourcentage de CEMs mortes par nécrose à j130 (p = 0,10) et le pourcentage de CEM mortes à j150 (p = 0,10) ont eu tendance à diminuer. De plus, SB a diminué le pourcentage de CEM en apoptose à j150 (p = 0,03). Ces résultats s'accompagnent d'une réduction de la concentration de cellules dans le lait (totales et CEM) (p < 0.05). Cela suggère une limitation de l'exfoliation des CEMs dans le lait indiquant un meilleur métabolisme mammaire avec l'extrait de plante. En conclusion, une supplémentation des vaches avec un extrait de plante riche en antioxydant induit des effets positifs sur la survie des cellules de l'épithélium mammaire.

Références :

1. Boutinaud et al. 2015 Front.Genet.6:323.
2. Herve et al. 2016 J Dairy Sci. 99(1):854-63.
3. Olagaray et al. 2019 PLoS ONE 14(1): e0210744.

SP7-1 - Utilisation des CAR-T cells en hématologie : aspects cliniques et biologiques

Actualités sur les cellules CAR-T

Pierre Bories

Toulouse

SP7-1 - Utilisation des CAR-T cells en hématologie : aspects cliniques et biologiques

Suivi biologique des CAR-T

[M. Roussel](mailto:mikael.rousseau@chu-rennes.fr) (mikael.rousseau@chu-rennes.fr)

CHU Rennes, Rennes, France

Les CAR-T cells sont des « médicaments vivants » induisant de fortes variabilités interindividuelles in vivo justifiant un suivi biologique. Par conséquent, la prise en charge des patients nécessite des stratégies de suivi pour détecter les réponses durables, les rechutes ou les effets secondaires potentiels à long terme. Depuis l'introduction des CAR-T cells en France, des recommandations nationales afin d'harmoniser les pratiques d'immunomonitoring ont été élaborées. Nous présenterons également les résultats d'une étude en « vie réelle » concernant l'utilisation de la cytométrie dans le monitoring de patients DLBCL traités par CAR-T. Dans notre étude, nous avons souhaité déterminer l'intérêt de ces analyses en CMF en comparant les populations lymphoïdes T circulantes entre patients DLBCL répondeurs et non répondeurs grâce aux données issues du suivi en cytométrie de 49 patients (28 répondeurs et 21 non répondeurs). Les résultats suggèrent notamment deux facteurs prédictifs de la réponse aux CAR-T cells : les lymphocytes T régulateurs présents initialement dans la réponse au traitement et le niveau d'épuisement des lymphocytes T CD8 effecteurs des lymphocytes non CAR-T. En conclusion, ces travaux démontrent un réel intérêt à l'étude des sous populations lymphoïdes T circulantes afin de mieux cibler les populations pouvant répondre au traitement.

Évaluation des Pratiques en Biosécurité dans les laboratoires de biologie médicale utilisant la cytométrie en flux. Résultats d'une Enquête Nationale

C. Parizot¹ (christophe.parizot@aphp.fr), V. Raggueneau²

¹ Département d'Immunologie, AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France

² Laboratoire d'hématologie et cytogénétique hématologique, Hôpital André Mignot, Centre hospitalier de Versailles, GHT Yvelines Sud, Le Chesnay, France

L'amélioration continue de la biosécurité dans les laboratoires de biologie d'hématologie et d'immunologie est essentielle pour garantir des conditions de travail optimales, avec une sécurité au travail par rapport au risque chimique et biologique. La gestion des effluents et des déchets est également un problème environnemental. Le groupe de réflexion sur la Biosécurité et environnement qui a été constitué par l'AFC en 2015, a pour objectifs de partager les expériences, de rédiger des recommandations de bonnes pratiques de travail en cytométrie en flux pour les plateformes de recherche. Ce groupe Biosécurité et Environnement de l'AFC et le CytHem se proposent aujourd'hui d'aborder les pratiques de biosécurité en cytométrie en flux dans les laboratoires de biologie clinique. Par le biais d'une enquête, nous avons proposé un questionnaire national visant à évaluer l'état actuel des pratiques dans la gestion des produits chimiques et des conditions de manipulation des prélèvements dans les laboratoires de biologie clinique effectuant des analyses de cytométrie en flux.

Ce questionnaire complet a été diffusé à l'ensemble des laboratoires d'hématologie et d'immunologie via les adhérents des associations de l'AFC et du CytHem. Il comportait 63 questions couvrant divers aspects, dont le pré-analytique, la préparation et la conservation des prélèvements, l'acquisition des données, le post analytique, ainsi que des questions générales sur les pratiques courantes en hygiène et sécurité et la formation du personnel.

Soixante-quinze centres ont répondu partiellement ou à l'ensemble de ce questionnaire entre 2021 et 2022 dont 85% d'hôpitaux publics.

L'objectif principal de cette enquête était de réaliser un état des lieux des pratiques actuelles, identifiant ainsi les domaines où des améliorations sont possibles.

Ces résultats serviront de base à la seconde phase de notre travail, au cours de laquelle nous élaborerons des recommandations pratiques visant à améliorer la gestion du risque chimique et biologique.

Identification de protéines microbiennes à partir de noyaux triés de racines de légumineuses infectées par un parasite tellurique

L. Camborde (laurent.camborde@univ-tlse3.fr), A. Kiselev, E. Gaulin

Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, CNRS/UT3/INP, Auzeville-Tolosane, France

Introduction et Objectifs :

Au cours d'une infection, de nombreux microorganismes parasites transfèrent dans les cellules végétales des protéines dites 'effecteurs'. Ces derniers retrouvés aussi bien dans l'apoplasme, le cytoplasme ou encore le noyau vont affecter la physiologie de la plante facilitant ainsi l'installation du parasite¹. Les oomycètes sont des microorganismes filamenteux eucaryotes causant de nombreux dégâts dans différents écosystèmes (aquatiques, terrestres). Parmi eux *Aphanomyces euteiches* est responsable de pourriture racinaire chez de nombreuses légumineuses comme le pois ou la luzerne². Capable de se maintenir une dizaine d'années sous forme de spores dormantes dans les sols, *A. euteiches* réduit considérablement les capacités de culture de légumineuses. Des données 'omics' sur le parasite^{1,3,4} ont permis de prédire que plusieurs centaines d'effecteurs seraient présents lors d'une infection tels que des petites protéines extracellulaires (SSP) de fonction inconnue^{3,5}. Ce projet vise à identifier les protéines d'*A. euteiches* présentes dans le noyau des cellules végétales infectées, afin d'appréhender les mécanismes moléculaires en lien avec les capacités d'invasion de ce parasite tellurique.

Matériels et Méthodes :

Des racines de la légumineuse *Medicago truncatula* ont été inoculées par le microorganisme *A. euteiches* en conditions contrôlées pour éviter toutes contaminations par d'autres agents microbiens. Les prélèvements racinaires ont été réalisés 4, 7 et 10 jours après infection, permettant au microorganisme de coloniser tout d'abord les couches superficielles de la racine (4-7 dpi) avant d'atteindre les parties les plus centrales (10 dpi). En parallèle, des racines traitées avec un tampon ont été collectées aux mêmes temps. Les échantillons ont été dilacérés au scalpel, filtrés, avant passage sur trieur pour caractériser les noyaux. Deux populations de noyaux (plante vs microorganisme) ont pu être identifiés facilitant le tri, l'enrichissement et la collecte des noyaux de *M. truncatula* et *A. euteiches*. Les protéines présentes dans les noyaux de *M. truncatula* infectés ou non, ont été identifiées par spectrométrie de masse.

Résultats, Discussion et Conclusion :

L'analyse comparative des données de spectrométrie de masse a permis d'identifier des protéines du parasite *A. euteiches*, dans les noyaux de racines de son hôte végétal. Environ 55 groupes de protéines avec différentes fonctions moléculaires (Glycosyl Hydrolase, Proteases, etc..) ainsi que cinq SSP ont été caractérisés. Environ 50% des protéines microbiennes présentent un peptide signal ainsi qu'un motif d'adressage au noyau (NLS), suggérant soit l'existence d'une voie d'adressage particulière chez ce parasite soit une contamination par des protéines cytoplasmiques lors des étapes de tri et d'enrichissement. Ces travaux montrent que les oomycètes phytopathogènes transfèrent des protéines dans les cellules hôtes probablement pour faciliter l'invasion. Leur caractérisation est grandement facilitée par l'utilisation des approches de cytométrie sur matériel végétal infecté.

Références :

1. Gaulin et al., 2018, BMC Biol., 16(43).
2. Becking, Kiselev et al., 2022, Fungal Biol Rev., 40(1-18).
3. Kiselev et al., 2022, J Fungi., 8(1):88.
4. Kiselev et al., 2023, Front. Plant Sci., 14.
5. Camborde et al., 2022, New Phytol., 233(5):2232-48.

Flow cytometry: a versatile tool to understand the biology of legume-rhizobium symbiosis

B. Alunni^{1,2} (benoit.alunni@inrae.fr), M. Bourge², P. Mergaert²

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE, Versailles, France

² Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

Unlike most cultivated plants that require nitrogen fertilizers to grow and produce a high yield, Legume plants can circumvent the paucity of nitrogen in agricultural soils by associating with soil bacteria called rhizobia. After mutual recognition of the partners, the plant produces a root organ, the nodule, where bacteria are housed intracellularly and fix atmospheric nitrogen into ammonia. The team has shown that within this organ, both plant and bacterial cells undergo a drastic cell cycle switch towards endoreduplication. Plants impose an extreme differentiation process to the bacteria, notably through the massive production of defensin-like antimicrobial peptides, requiring the presence of an ABC transporter in the bacterium to sustain such stress. In this talk, I highlight how flow cytometry approaches were developed over the last 25 years and were instrumental to characterize this symbiotic system and understand the role of the antimicrobial peptides and cognate transporters in the bacterial differentiation process.

Étude de la bactérie *Cupriavidus necator* pour une application spatiale en support vie : Utilisation de la cytométrie en flux pour caractériser la composition de la biomasse

P. Joris¹ (joris@insa-toulouse.fr), E. Lombard², G. Navarro³, A. Paillet³, S. Guillouet⁴, N. Gorret⁵

¹ TBI, INSA de Toulouse, Toulouse, France

² TBI, CNRS, Toulouse, France

³ CNES, Toulouse, France

⁴ TBI, INSA de Toulouse, Toulouse, France

⁵ TBI, INRAE, Toulouse, France

Introduction et Objectifs :

Depuis quelques années, les Etats de par le monde se sont relancés dans une course à l'espace. L'objectif final est d'envoyer des humains sur Mars, mais d'abord, la Lune est ciblée par les agences spatiales comme étape intermédiaire et les êtres-humains devraient être de retour à sa surface d'ici 2025. En raison des distances impliquées et de la durée du vol, les prochaines étapes de l'exploration spatiale apparaissent comme un immense défi. Le système de support vie des astronautes doit être capable de maintenir des conditions favorables à la vie humaine en convertissant continuellement les déchets produits dans le système, en composés nécessaires à l'équipage comme l'eau, l'oxygène ou la nourriture. Deux types de production (protéines et biomatériaux) ont été identifiés comme critiques et pourraient être réalisés par un micro-organisme unique comme *C. necator* à partir de mélange d'Acides Gras Volatiles obtenu par digestion anaérobie des déchets des astronautes. Comme la microgravité provoque une perte musculaire rapide, les protéines d'organismes unicellulaires (SCP) pourraient être utilisées comme un ingrédient riche en protéines pour la préparation de la nourriture de l'équipage. De plus, *C. necator* est bien connue pour sa capacité à produire des polyhydroxyalcanoates (PHA). En couplant le système de support vie à une imprimante 3D, les astronautes pourraient disposer d'une source de matériaux et ainsi limiter les réapprovisionnements.

Matériels et Méthodes :

Sachant que les systèmes de support vie fonctionnent en continu sous formes boucles, des cultures continues ou chemostats ont été réalisés en bioréacteurs instrumentés. Ainsi, l'effet du taux de dilution du bioréacteur et de la nature des sources de carbone (glucose vs mélange d'acides gras volatiles (AGV) vs AGV individuels) sur la composition de la biomasse ont été étudiés. La cytométrie en flux a été utilisée pour déterminer la composition de la biomasse en termes de PHA et d'acides nucléiques (ARN et ADN). Pour cela différents marqueurs de fluorescence ont été employés : Nile Red, RNA select, Syto 13 et Syto 9. Ces composants cellulaires ont également été caractérisés par l'intermédiaire de techniques analytiques quantitatives (GC-FID, kit de quantification Picogreen et Ribogreen).

Résultats et Discussion :

Les différentes conditions testées ont ainsi pu être décrites en termes de distribution de populations concernant l'accumulation des composés cellulaires recherchés. De plus, les données obtenues en cytométrie ont été comparées aux dosages quantitatifs des composants de la biomasse. Des corrélations ont pu être établies entre les marquages au RNA select et Nile Red et le taux de dilution et les quantités d'ARN et de PHB.

Characterization of plasmid expression level heterogeneity, at single cell level, through heterologous eGFP expression in co-expression with recombinant isopropanol production in *Cupriavidus necator*

P. Pijpstra¹ (pijpstra@insa-toulouse.fr), S. E. Guillouet², P. Heindinger³, R. Kourist⁴, N. Gorret², J.-L. Parrou⁵, A. Boy^{2,5}

¹ INSA Toulouse, Toulouse, France

² TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

³ ACIB - Austrian Centre of Industrial Biotechnology, ACIB GmbH, Graz, Autriche

⁴ Institut für Molekulare Biotechnologie, Technische Universität Graz, Graz, Autriche

⁵ Plateforme Genome et Transcriptome (GeT-Biopuces), TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

Introduction:

Axenic cultures grown in controlled environments are assumed to be homogeneous and considered to be composed of identical individuals. Several studies have proven the opposite, even in the case of monoclonal cultures. This phenomenon is particularly amplified at industrial scale, leading to a reduction in production performances and a loss of robustness of bioprocesses. Ensuring phenotypic homogeneity during overproduction of molecules of interest by engineered strains therefore constitutes a major challenge for synthetic biology, and bioprocess development and optimization. A well-established method in strain engineering is the use of plasmids due to their ease of use, adjustable expression level, and interchangeability between species. However, in the absence of a selective pressure targeting plasmid-born antibiotic resistance or auxotrophy marker genes, plasmids are often quickly lost. Because these pressures are too costly and often heavily regulated for industrial usage, plasmids are not used to their full potential in bioprocesses. Therefore, plasmid stability is of great interest. In this study we investigate plasmid stability in engineered *C. necator* producing isopropanol.

Materials and Methods:

Plasmid stability has been studied through various techniques including qPCR, fluorescence microscopy and cytometry^{1,2,3}. Previously, green fluorescent protein (eGFP) biosensors were developed and applied in combination with cytometry, allowing tracking of subpopulations through the course of a well-controlled fermentation^{4,5}. Here, plasmid stability was studied in *C. necator* co-expressing eGFP constitutively and a heterologous isopropanol (IPA) biosynthetic pathway under the control of an arabinose inducible promoter (pJLCB2 strain). Different culture conditions were tested to determine the effect of the isopropanol gene cluster overexpression on the robustness of the engineered *C. necator*. For an in-depth understanding of the nature of these subpopulations, quantitative methods based on cell sorting coupled to ddPCR and RT-qPCR have been implemented.

Results, Discussion and Conclusion:

During well-controlled fedbatch culture of pJLCB2 strain under isopropanol production condition, a biomass concentration of 40 g_{DW}L⁻¹ and IPA concentration up to 6 gL⁻¹ were obtained. However, 20 hours after induction (corresponding to 1 generation), a segregation of the population into an eGFP- subpopulation (10 %) took place and gradually increased up to 80 % after 100 hours of culture (4 generations), suggesting the loss of IPA production in a large part of the population⁵. To assess the impact of metabolic burden, number of generations, and isopropanol concentration on strain robustness, chemostat cultures were carried out where constant biomass concentrations were observed in the different conditions. Isopropanol production resulted in an increase in propidium iodide (PI) cell permeability (up to 20 %). Under non-induced condition after 12 generations an eGFP- subpopulation (20%) was detected, and became more pronounced after induction, reaching up to 98 % of the population after 21 generations (of which 9 generations were induced). This observation was coherent with the trends exhibited from plate counting methods, leading to hypothesis that some of the loss of eGFP expression was linked to a massive loss of plasmid during culture under production conditions. This was confirmed through a CNV (Copy Number Variation) approach coupling cell sorting and ddPCR.

Références :

1. Bahl et al., 2004, FEMS Microbiology Letters, 232(1), 45–49.
2. Lee et al., 2016, Nucleic Acids Research, 44(1), 1-9.
3. Shao et al., 2021, Nature Communications, 12(1), 1-9.
4. Boy et al., 2022, Journal of Biotechnology, 345(2022), 17–29.
5. Boy et al., 2022, Enzyme and Microbial Technology, 161(2022).

Viabilité de *Saccharomyces cerevisiae* pendant la cuisson de la pâte à pain par cytométrie en flux

B. Fifani (b.fifani@lesaffre.com), A. Da Silva, F. Doppler, L. Jelonkiewicz, M. Rezaei, C. Lesens, R. Toussaint, M. Durand-Dubief

Lesaffre international, Marquette lez lille, France

Introduction et Objectifs :

La cytométrie en flux (CMF) n'a jamais été utilisée pour caractériser la viabilité des microorganismes dans une matrice alimentaire fermentée complexe comme la pâte à pain ou le pain cuit. Cette étude a pour objectif de développer une méthode d'analyse par CMF qui permet de suivre la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae* pendant la phase de cuisson du pain et de la comparer avec la méthode de comptage d'unité formatrice de colonie (CFU) et imagerie de fluorescence.

Matériels et Méthodes :

Les pâtes à pain ont été préparées avec deux souches de levure sèche instantanée (SC1 et SC2) en triplicat. Les levures ont été dénombrées dans la pâte/le pain à différents moments du processus de cuisson (0, 10, 12, 14,5 et 21 min).

La méthode de CMF a été développée avec un Attune® NxT équipé d'un laser bleu et configuration standard : détecteurs FSC, SSC, BL-1 (530/30 nm) et BL-4 (780/60 nm). Les levures ont été marquées avec le LDS751, molécule intercalante de l'ADN et le DiBAC4, un colorant oxonol potentiométrique indicateur du potentiel membranaire. Les canaux BL-1 et BL-4 ont été utilisés pour détecter le signal du DiBAC4 et LDS751 respectivement.

Pour les tests CFU, 100 µL d'échantillons dilués en série (10e-1 à 10e-6 fois) ont été étalés sur une plaque de gélose Yeast Media et incubés trois à cinq jours à 25 °C.

Les échantillons du Cellometer X2 ont été colorés à l'aide du kit de levure Cellometer ViaStain™ pour concentration vivante/morte. Les levures ont été comptées conformément aux spécifications du fabricant combinant les détections de canaux de fluorescence verte et rouge.

Résultats, Discussion et Conclusion :

La méthode de CMF développée dans cette étude a permis de suivre la viabilité de *S. cerevisiae* dans la pâte à pain pendant la cuisson. La viabilité de la souche de levure SC1 au début de la cuisson est de $93,1 \pm 1,8$ %, elle reste relativement stable jusqu'à 10 min de cuisson puis baisse drastiquement à 12 min pour atteindre près de 0% à 14,5 min. Des résultats similaires sont observés avec la souche de levure SC2.

Les résultats obtenus par CMF ont été corrélés à ceux des CFU et imagerie de fluorescence en traçant la viabilité relative de la levure obtenue par chacune des trois méthodes. Des scores de similarité élevés sont observés avec la méthode CMF par rapport à l'imagerie de fluorescence ou aux CFU pour les souches SC1 et SC2.

Ceci confirme que l'analyse par CMF est une méthode robuste, fiable, donnant des résultats comparables à ceux obtenus par la méthode standard de dénombrement : CFU. Elle peut être une approche utile pour détecter les populations de levures vivantes et mortes dans la matrice du pain dans la recherche et les études de routine.

Role of the transcription factor Eomes in chronic inflammatory diseases

A. Dejean (anne.dejean@inserm.fr)

Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (INFINITY), Toulouse, France

The tissue accumulation of T cells expressing Eomes has been reported in several chronic inflammatory diseases. However, the mechanisms whereby Eomes controls this accumulation and strengthens inflammation remains ill-defined. We show that Eomes deletion is sufficient to protect against central nervous system (CNS) inflammation. We demonstrate that Eomes is required for long-term survival of CNS-infiltrating CD4+ T cells. Our transcriptomic and epigenetic studies reveal that Eomes increases effector CD4+ T cell longevity by sustaining the expression of multiple genes involved in mitochondrial organization and function. Besides, the significance of these findings was confirmed in both healthy donors and multiple sclerosis patients. Together, our data reveal a new mechanism by which Eomes promotes chronicity of inflammation *via* the enhancement of CD4+ T cell mitochondrial functions and resistance to stress-induced cell death. The tissue accumulation of T cells expressing the transcription factor Eomesodermin (Eomes) has been reported in several chronic inflammatory diseases, including multiple sclerosis. However, the mechanisms whereby Eomes controls this accumulation and strengthens inflammation remains ill-defined. Here, we show that Eomes deletion in antigen-specific CD4+ T cells is sufficient to protect against central nervous system (CNS) inflammation. We demonstrate that Eomes is dispensable for the initial priming of CD4+ T cells but is required for long-term maintenance of CNS-infiltrating CD4+ T cells. Our transcriptomic studies reveal that the impact Eomes on effector CD4+ T cell longevity is associated with sustained expression of multiple genes involved in mitochondrial organization and function. Accordingly, epigenetic studies demonstrate that Eomes supports mitochondrial function by direct binding to either metabolism-associated genes or mitochondrial transcriptional modulators. Besides, the significance of these findings was confirmed in both healthy donors and multiple sclerosis patients. CD4+ T cells expressing Eomes exhibit enhanced mitochondrial functions, which resulted in their increased capacity to survive upon prolonged *in vitro* stimulation. Together, our data reveal a new mechanism by which Eomes promotes severity and chronicity of inflammation *via* the enhancement of CD4+ T cell mitochondrial functions and resistance to stress-induced cell death.

Références :

1. Emeline Joulia, Michaël F Michieletto, Arantxa Agesta, Cindy Peillex, Virginie Girault, Anne-Louise Le Dorze, Romain Peroceschi, Florence Buccarelli, Marion Szelechowski, Adeline Chaubet, Nawad Hakim, Rémi Marrocco, Emeline Lhuillier, Manuel Lebeurrier, Rafael J. Argüello, Abdelhadi Saoudi, Hicham El Costa, Veronique Adoue, Thierry Walzer, Jean-Emmanuel Sarry, and Anne S Dejean*, J. Exp. Med., In press.

Mécanisme et potentielle thérapie du choc anaphylactique

Laurent Reber

Toulouse

Impact du stress prénatal maternel sur la programmation à long terme des Lymphocytes T CD4+

R. Barascud¹ (rebecca.barascud@inserm.fr), R. Marrocco¹, I. Bernard¹, C. Petitfils², S. Maurel², N. Cénac², A. Saoudi¹

¹ INSERM, INFINITY, Toulouse, France

² INSERM, IRSD, Toulouse, France

Objectif :

Des études ont démontré un impact clair du stress prénatal sur la susceptibilité ultérieure de la progéniture à développer des maladies psychopathologiques, des troubles du développement neurologique, une dysbiose du microbiote et des pathologies immunes de type Th2 (dermatite atopique et allergies notamment). Cependant, bien que plusieurs études aient établi une association entre la dérégulation du système immunitaire, la dysbiose du microbiote et l'auto-immunité du système nerveux central (SNC), l'impact du stress prénatal sur la susceptibilité à l'inflammation du SNC reste peu connu.

Méthodes :

Afin d'étudier l'impact du stress prénatal sur la susceptibilité de la progéniture à l'inflammation du SNC, nous avons mis au point un protocole dans lequel les femelles gestantes subissent un stress pendant une période spécifique de la gestation pour imiter un stress psychologique. Ensuite, nous avons induit une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de sclérose en plaques, chez la progéniture à l'âge adulte. Des études fonctionnelles des cellules T auto-spécifiques ont été entreprises pour comprendre les mécanismes impliqués.

Résultats :

Nous avons observé que les descendants adultes de mères ayant subi un stress prénatal (PS) ont développé une EAE moins sévère que les descendants de mères non stressées (CT). Ce phénomène était associé à une accumulation de cellules immunitaires dans les ganglions lymphatiques drainants et à une infiltration réduite de cellules immunitaires dans le SNC (cerveau et moelle épinière). En outre, la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ et GM-CSF notamment) par les cellules T conventionnelles (Tconv) a diminué dans la condition PS. Néanmoins, les cellules T régulatrices (Treg) ne semblent pas impliquées dans ce phénotype. En utilisant des expériences de transfert adoptif, nous avons montré que l'impact du stress prénatal est intrinsèque aux cellules Tconv CD4+.

Conclusion :

Dans l'ensemble, notre étude montre que le stress prénatal influence la susceptibilité de la progéniture adulte à l'inflammation du SNC, en ayant un impact intrinsèque sur les fonctions des cellules T CD4+. Des analyses transcriptomiques et épigénétiques sur les cellules T CD4+ sont en cours pour déchiffrer les mécanismes moléculaires sous-jacents par lesquels le stress prénatal diminue les fonctions intrinsèques des Tconv. Enfin, des analyses du microbiote intestinal et des métabolites bactériens en contexte d'EAE sont en cours et pourraient également expliquer les différences de sévérité de pathologie que nous avons observé dans cette étude.

Workflow d'analyse de données de cytométrie de flux totalement automatisé pour évaluer les effets de candidats adjuvants sur les compartiments de cellules B et T mémoires dans un essai clinique de phase I

P.-E. Jouve¹ (pierre.jouve@altrabio.com), J. Nourikyan¹, K. Alves¹, S. Begue², F. Jeantet², A. Pagnon², F. Piras-Douce²

¹ ALTRABIO, Lyon, France

² SANOFI R&D Vaccins, Marcy l'Étoile, France

De manière générale les approches utilisées pour l'analyse computationnelle de données de cytométrie sont de deux grands types :

1. Les analyses supervisées pour lesquelles les populations cellulaires à identifier et à quantifier sont définies a priori. Ce type d'analyse comprend l'identification de types cellulaires par gating manuel ou par gating automatique pour lequel l'étape d'identification manuelle est remplacée par l'utilisation d'algorithmes computationnels dédiés. Les caractéristiques (MFI, abondance, etc.) des populations quantifiées sont ensuite analysées.
2. Les analyses non/semi supervisées pour lesquelles les populations à identifier et quantifier ne sont pas définies a priori. Ce type d'analyse rassemble quant à lui les approches dites de réduction de dimension telles que UMAP, t-SNE (etc.) qui ont pour objet de visualiser l'organisation des cellules en types cellulaires distincts et les approches dites de clustering (FlowSOM, Phenograph, etc.) qui visent à identifier des types cellulaires dont les caractéristiques (MFI, abondance, etc.) seront là aussi subséquemment analysées.

Dans le présent essai clinique de phase I, les populations de lymphocytes T folliculaires auxiliaires (Tfh) et plasmablastes B circulants ont été phénotypées et quantifiées ex-vivo à l'aide d'un panel qualifié de 13 marqueurs par cytométrie en flux sur des échantillons de PBMC prélevés sur des sujets ayant reçu un vaccin avec différents candidates adjuvants.

Une première analyse supervisée, réalisée par un algorithme visant à identifier des populations cellulaires prédéfinies, complétée par une analyse de différentiel d'abondance a montré qu'il existait une différence sur les fréquences des plasmablastes et des Tfh en fonction des adjuvants administrés. L'activation des cellules Tfh et plasmablastes donne un aperçu des mécanismes sous-jacents à la réponse immunitaire et conforte les différences de réponse en anticorps observées pour les adjuvants testés.

Pour une exploration plus approfondie, l'ensemble des données de cytométrie en flux complet a aussi été analysé via une analyse non supervisée visant à identifier des populations cellulaires non définies préalablement, utilisant notamment les résultats de l'analyse supervisée pour faciliter l'annotation des populations identifiées. Cette analyse non supervisée peut mettre en évidence des associations inattendues ou des caractéristiques distinctes entre les groupes pour l'identification potentielle de biomarqueurs.

Des analyses de différentiels d'abondance des populations identifiées obtenu par les deux méthodes supervisées et non supervisées ont ainsi été réalisées. Quelques un des résultats obtenus seront mis en avant de manière à souligner l'intérêt d'une utilisation combinée et systématisée des approches supervisées et non supervisées tant du point de vue des informations / connaissances qu'elles permettent d'extraire, que du point de vue de l'interprétation des résultats fournis par chaque approche, et du point de vue de l'efficacité de l'analyse par rapport aux approches classiques.

Deciphering the Functional Heterogeneity of Cytotoxic T Lymphocytes

R. Khazen¹ (roxana.khazen@inserm.fr), A.-L. Iscache², H. Rodriguez¹, S. Mueller¹, F. Lfaqihi², S. Valitutti¹

¹ Cancer research center of Toulouse, Inserm U1037, Toulouse, France

² Technical platform of cytometry and cell sorting, Infinity institute, Inserm U1291, Toulouse, France

Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) exhibit a remarkable diversity in their expansion and differentiation, yielding a spectrum of killer cells with varying cytotoxicity. This heterogeneity within CTL populations plays a pivotal role in shaping robust immune responses. Recent breakthroughs in high-throughput single-cell technologies, capable of probing CTLs at both RNA and protein levels, have unveiled a rich tapestry of functional phenotypes across human tissues. While the origins of this functional diversity can be attributed to intrinsic factors, such as the expression levels of lethal molecules, and extrinsic factors, such as the suppressive tumor microenvironment (TME), we hypothesize that a tunable intercellular communication among CTLs may be involved in skewing global CTL killing activity toward an optimal outcome.

To explore this hypothesis, we have leveraged multiplex flow cytometry in conjunction with high-dimensional analysis to elucidate distinct CTL lytic signatures and identify subsets of «super-killer» CTLs. Our investigation includes the sorting of various CTL subpopulations, revealing an intriguing relationship: individual super-killer CTL subsets exhibit reduced efficiency in the absence of poor-killer CTL subsets, highlighting the integral role of internal regulation in shaping the cytotoxic capacity of CTLs at the population level. Our preliminary findings indicate a pivotal role for interferon gamma (IFN- γ) in fine-tuning collective CTL killing responses.

In summary, our study endeavors to unravel the molecular determinants that define CTL subsets at an interclonal level, shedding light on the intricate interplay within the heterogeneous nature of CTLs in the context of cancer progression. Our findings introduce the concept of «smart surveillance» by CTLs, offering insights into how these killer cells collectively adapt to eradicate tumor cells.

Utilisation de techniques de biologie des systèmes pour une analyse détaillée de la réponse immunitaire au vaccin à ARN messenger BNT162b2 chez les patients ayant bénéficié d'une allogreffe

O. Kwan¹ (okwan@uliege.be), L. Canti¹, G. Ehx¹, Y. Beguin², S. Humblet-Baron³, F. Baron¹

¹ Hématologie - GIGA I3, Université de Liège, Liège, Belgique

² Département de Médecine, Hématologie, CHU de Liège, Liège, Belgique

³ Immunologie Adaptative, KU Leuven, Leuven, Belgique

Introduction et Objectifs :

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-HCT) est la meilleure option thérapeutique pour de nombreux patients atteints de maladies hématologiques graves. Cette procédure thérapeutique induit une immunosuppression sévère qui peut persister des mois ou même des années après la greffe. Les infections causées par le SARS-CoV2 peuvent entraîner des complications sévères et dans les pires situations le décès des patients allogreffés, particulièrement lorsqu'ils souffrent de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Il est cependant difficile d'établir une protection durable chez les patients allogreffés car leur système immunitaire met plusieurs mois/années pour se reconstruire après la greffe, et ce particulièrement chez les patients ayant une GVHD chronique. Dans ce projet, nous avons effectué une analyse des systèmes biologique visant à mieux comprendre la réponse au vaccin BNT162b2 contre le SARS-CoV2.

Matériel et Méthodes :

Les patients ont reçu trois doses du vaccin BNT162b2 : jours 0 (1^{ère} dose), 21 (2^{ème} dose) et +/- 150 (3^{ème} dose). Nous avons réalisé un séquençage à ARN en vrac aux jours 0 et 1 pour la 1^{ère} et 3^{ème} doses, correspondant aux jour 0/jour 1 et jour 150/jour 151 respectivement. Nous avons ensuite comparé l'expression des gènes au jour 1 contre le jour 0 et au jour 151 contre le jour 150 par une méthode pairée. Pour étudier les voies de signalisation à partir des gènes surexprimés, nous avons utilisé le package R « Tmod ». Par la suite, nous avons cherché à savoir si l'expression des gènes au départ (jour 0) permettait de prédire la réponse des anticorps (Ab) face au vaccin après la 1^{ère} et 3^{ème} dose.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Une réponse sérologique a été détecté chez 39/46 (84%) patients naïfs d'une infection COVID-19 après la 2nd dose et chez 40/41 (97%) patients après la 3^{ème} dose du vaccin^{1,2}. Nous avons observé 146 et 4005 gènes significativement surexprimés après la 1^{ère} et 3^{ème} dose du vaccin, respectivement. En groupant les gènes surexprimés en voies de signalisation, nous avons observé quatre modules surexprimés après la 1^{ère} dose (3 modules concernant une signature d'interféron (IFN) et un module concernant l'activation des cellules dendritiques). Ces quatre modules et neuf modules additionnels ont été identifié après la 3^{ème} dose. Il est intéressant de noter que la surexpression des IFN n'était pas corrélée à la production des Ab en réponse au vaccin chez nos patients. Nous avons observé que des voies de signalisation des cellules B étaient surexprimées chez les répondeurs par rapport aux non-répondeurs. En conclusion, nous avons observé que le vaccin induit une réponse IFN qui est supérieure à la 3^{ème} dose par rapport à la 1^{ère} dose. Contrairement à ce qui a été observé chez les sujets sains³, la réponse IFN n'est pas corrélée avec la réponse sérologique chez les patients allogreffés. Enfin, une signature des cellules B au départ prédit une meilleure réponse sérologique.

Références :

1. Canti, L., Humblet-Baron, S., Desombere, I., Neumann, J., Pannus, P., Heyndrickx, L., Henry, A., Servais, S., Willems, E., Ehx, G., et al. (2021). Predictors of neutralizing antibody response to BNT162b2 vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Hematol Oncol* 14, 174. 10.1186/s13045-021-01190-3.
2. Canti, L., Ariën, K.K., Desombere, I., Humblet-Baron, S., Pannus, P., Heyndrickx, L., Henry, A., Servais, S., Willems, E., Ehx, G., et al. (2022). Antibody response against SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants after third-dose BNT162b2 vaccination in allo-HCT recipients. *Cancer Cell* 40, 335–337. 10.1016/j.ccell.2022.02.005.
3. Arunachalam, P.S., Scott, M.K.D., Hagan, T., Li, C., Feng, Y., Wimmers, F., Grigoryan, L., Trisal, M., Edara, V.V., Lai, L., et al. (2021). Systems vaccinology of the BNT162b2 mRNA vaccine in humans. *Nature* 596, 410–416. 10.1038/s41586-021-03791-x.

Flow cytometry based functional assay to study the bias of PBMC analysis compared to whole blood

I. Ait-Belkacem (iaitbelkacem@beckman.com), C. Cartagena Garcia, J. M. Busnel

Beckman Coulter Life Sciences Immunotech, Marseille, France

Background:

The analysis of blood-derived cells by flow cytometry plays a central role in a wide range of research and clinical studies including human immunodeficiency virus research, fundamental studies of cytokine-based immune responses and cancer immunotherapy. The most common application of flow cytometry is peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) immunophenotyping and functional assays. It allows the assessment of cell surface and intracellular molecule expression such as the 'cluster of differentiation' (CD) markers to identify, differentiate and characterize sub-populations of PBMCs. However, the use of PBMC implies the loss of neutrophils as well as serum and all its components such as antibodies and cytokines.

Hypothesis:

We therefore hypothesized that the use of PBMCs for *ex vivo* activation experiments might be subject to a significant bias due to the depletion of these components, which may be required for some immune responses.

Method:

In this study, we have compared the immunophenotyping status between whole blood and corresponding PBMC samples, incubated with multiple immune activators, in a cohort of 10 volunteers. Two distinct multiparametric panels (ten colors) were used to deeply phenotype monocytes and lymphocytes. To substitute serum components, PBMCs were suspended in RPMI 1640 medium only (RPMI 100%), RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (RPMI FBS 10%), or in a 100% FBS solution (FBS 100%).

Results:

PBMCs suspended in RPMI 100% displayed impaired monocytes and a very low lymphocyte activation ability when compared to whole blood. Adding 10% of FBS allowed to improve monocyte recovery and partially recover leucocyte activation. PBMCs resuspended in 100% FBS displayed the best monocyte recovery and leucocyte activation levels. Still, a strong increase in basal marker levels was observed in the last two conditions due to FBS addition.

Conclusion and discussion:

In comparison with whole blood, the use of PBMC may induce a bias in cell phenotyping. Given that the RPMI FBS 10% condition is most often used in this type of analysis, it is necessary to bear in mind that in these conditions some essential compounds are lacking (neutrophils and serum components), and that conversely, other added elements (RPMI or FBS) may introduce a bias. It may be preferable, when conditions allow, to use whole blood, as this is closer to the biological condition *in vivo*, and as it has the advantage of being faster and more standardized than PBMC preparation.

Xenogeneic graft-versus-host disease in humanized NSG and NSG-IL15 mice

J. Courtois¹ (j.courtois@uliege.be), C. Ritacco¹, S. Dubois¹, L. Canti¹, C. Daulne¹, Y. Beguin^{1,2}, G. Ehx¹, F. Baron^{1,2}

¹ GIGA-I3 Hématologie, Université de Liège, Liège, Belgique

² Hématologie Clinique, CHU de Liège, Liège, Belgique

Background:

Graft-versus-host disease (GVHD) has remained a serious limitation of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. IL-15 is a member of the cytokine receptor gamma chain family which stimulates *in vitro* the proliferation of T cells. Here, we compared xenogeneic GVHD (xGVHD) in humanized NSG and NSG mice expressing IL-15 (NSG-IL15 mice).

Methods:

XGVHD was induced by i.v. injection 20x10⁶ human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) in NSG and NSG-IL15 mice on day 0. GVHD severity was assessed by a scoring system that incorporates four clinical parameters: weight loss, posture, mobility, and anemia. Each parameter received a score of 0 (minimum) to 2 (maximum). Mice were followed for xGVHD score and survival. In addition, human T-cell engraftment and as well as human T-cell subtypes were monitored in NSG and NSG-IL15 blood on days 14, 21 & 28. This experiment was assessed in 2 independent experiments using hPBMC from 2 different donors.

Results:

We first compared xGVHD in NSG and NSG-IL15 mice transplanted with 20x10⁶ hPBMCs. Combining data from the 2 experiments, xGVHD lethality and severity were higher in NSG-IL15 than in NSG mice (median 30 versus 37 days; HR= 1,943, 95% CI: 0,9519-3,967; P= 0,0151). This was associated with higher engraftment of human T cells in NSG-IL15 mice. Looking at T-cell subsets, in comparison to NSG mice, NSG-IL15 mice had higher number of hCD45+, CD4+, naive CD4+ and CD8+ T cells on days 14 and 21 and higher number of CD8+ TEMRA on days 14, 21 and 28 in their peripheral blood.

Conclusion:

In summary, our data indicates that NSG-IL15 mice seems developing more severe xGVHD than NSG mice transplanted with hPBMC. The higher number of CD4+ and CD8+ T cells on days 14 and 21 post-transplant, the more severe GVH phenotype, and the positivity for KI67 and HLA-DR markers on day 28 suggest that there is greater T cell activation in NSG-IL15 mice than in conventional NSG mice.

Lien de causalité entre l'expression bi-allélique de TLR7 et le développement d'auto-anticorps pathogéniques dans le lupus systémique érythémateux

L. Ferrayé (lea.ferraye@inserm.fr), C.-H. Miquel, B. Faz-Lopez, F. Abbas, M. Savignac, J.-C. Guéry

INFINITY, Toulouse, France

Introduction et Objectifs :

L'incidence des maladies auto-immunes, comme le lupus systémique érythémateux (LES) est nettement augmentée chez les femmes et chez les hommes atteints du syndrome de Klinefelter (XXY), par rapport aux hommes (XY), probablement en relation avec des différences de dosage des gènes du chromosome X. En effet, au cours du développement, dans les cellules femelles, un des deux chromosomes X est inactivé de façon aléatoire afin d'égaliser le dosage des produits géniques du chromosome X entre les femelles (XX) et les mâles (XY). Cependant certains gènes peuvent échapper à l'ICX, entraînant une expression accrue de certains gènes liés à l'X. Le gène *Tlr7* localisé sur le chromosome X code pour un récepteur endosomal qui reconnaît l'ARNsb viral mais aussi de l'ARN du soi, conduisant potentiellement à une inflammation ou une auto-immunité. En effet, exprimé à double dose, *Tlr7* est suffisant pour déclencher l'auto-immunité chez la souris. Nous avons récemment démontré que TLR7 échappe à l'ICX dans différents types de cellules immunitaires. Cet échappement confère au compartiment B une réactivité accrue aux ligands de *Tlr7* associé à un risque plus élevé des femmes à développer un lupus.

L'objectif de notre projet est d'étudier la relation causale entre l'expression bi-allélique de *Tlr7* et le développement de la pathogenèse lupique.

Matériel et méthodes :

Nous avons développé des modèles génétiques de souris rapporteurs/délétères pour le gène *Tlr7* qui permettront de tracer les cellules bi-alléliques pour *Tlr7*, mais également de les éliminer. Les deux allèles de *Tlr7* sont couplés à un fluorochrome différent (*Tlr7*YFP-Cre/ *Tlr7*mCherry). Ce modèle double rapporteur a été rétrocroisé sur le fond génétique lupique B6.NZM Sle1,2,3. La caractérisation du modèle B6.NZM Sle1,2,3 reporter a été réalisée par de multiples approches, notamment par de la cytométrie en flux, afin de suivre l'expression des rapporteurs pour *Tlr7* et de connaître dans quels compartiments cellulaires se retrouvent les cellules bi-alléliques. D'autres approches ont été mises en œuvre afin de bien caractériser notre modèle comme des expériences de RNA-fish (pour évaluer les transcrits primaires de *Tlr7* dans différentes populations), des dosages des auto-anticorps par ELISA, et également des expériences histologiques.

Résultats, discussion et Conclusion :

Nous avons montré une dérégulation immunitaire dans les souris lupiques âgés par rapport à des souris WT, avec notamment une augmentation de la fréquence d'un sous-ensemble de « cellules B associées à l'âge (auto-immunité) » (ABC), qui apparaît comme une source cellulaire clé d'auto-anticorps dans le LES. De plus, nous avons montré que la fréquence des cellules bi-alléliques est significativement augmentée dans tous les sous-types de lymphocytes B, mais de manière plus importante dans les ABC.

Par ailleurs, l'augmentation du titre d'auto-anticorps dans le serum des souris lupiques est corrélée à l'émergence des ABC.

Ce projet vise à démontrer de manière directe les conséquences fonctionnelles du biallélisme *Tlr7* sur le développement des ABC pathogéniques dans un modèle de lupus spontanée chez la souris. Nous nous attendons à ce que l'élimination des cellules bi-alléliques pour *Tlr7* dans notre modèle de délétion protège du LES.

Innate immunity blood biomarkers can help for the triage of infectious and emerging diseases

F. Malergue (fmalergue@beckman.com)

R&D Life Sciences, Immunotech, Marseille, France

Background:

Infectious diseases are a major threat worldwide. The healthcare system aims at preventing / diagnosing / isolating / treating. Diagnosis is a pillar of the system as it allows accurate treatment or isolation; still it is challenged by the huge pathogen diversity, their variability, and the similar symptoms they often produce. Today most of the treatments are based on a probabilistic approach, and formal diagnosis requires time and budget to run multiple assays in parallel. Using immune biomarkers for the rapid triage of patients would save time and effort. Especially biomarkers able to discriminate viruses and bacteria could drive an immediate isolation of viral cases or a justified antibiotic treatment of bacterial cases, and could reduce by half the number of confirmatory diagnostic assays to be run.

Methods:

Very few markers have been proposed so far, and even fewer have been used in multiple studies. Regarding a bacterial infection, CD64 (FcγR1) on neutrophils is by far the most studied and has shown a strong sensitivity. Regarding a viral infection, CD169 (Siglec1) on monocytes has recently been described as a direct consequence of type-1 Interferons (IFNα or β) production by the infected host. Both markers rely on rapid innate immune responses and are upregulated at the onset of symptoms.

Results:

CD169 shows a very strong sensitivity for all viruses studied so far. A combination of CD169 and CD64, using a robust and rapid one-step flow cytometry method, has been evaluated by multiple teams to study multiple pathogens (1-5) confirming it has many advantages: 10-15 min time to result, high sensitivity, low cost, high throughput, point of care testing capability through fingerprick.

Conclusion:

Such a combination of biomarkers has the capability of rapidly triaging patients in any infectious situation, especially at the emergency units and during disease outbreaks. It further has the unique advantage of being ready for any emerging disease, where classical specific assays need months to be re-developed, thus providing a first line of preparedness.

Références :

1. Comins-Boo A, 2021, Front Med (Lausanne)., Mar 23;8:655785.
2. Michel M, 2022, SAGE Open Med.,20503121221115483
3. Herzog S, 2023, Front Med (Lausanne)., Sep 23;9:979373.
4. Gatti A, 2023, J Anesth Analg Crit Care., 3(1):6.
5. Pratesi C, 2023, communication 8eme Congrès SIPMeL 9-11 Octobre.

One step process analysis avoids loss of monocytes in cerebrospinal fluid (CSF)

E. Millet Wallisky¹ (milletewa@gmail.com), F. Malergue¹, J. Boucraut²

¹ Recherche et développement, Beckman Coulter Life Science, Marseille, France

² Laboratoire d'immunologie, AP-HM, Marseille, France

Introduction and Objectives:

Flow cytometry analysis of cerebrospinal fluid (CSF) sample is broadly used in hospital laboratories for immune cell phenotyping. It is especially useful in case of tumoral invasion of the central nervous system but lacks sensitivity mostly because of pre-analytical requirements [1]. Indeed, immune cells contained within CSF samples are unstable and prone to rapid cell death [2]. In this preliminary work, we aim to characterize more precisely the immune cell loss occurring in CSF samples and find ways to improve their stability.

Material and Method:

One-step staining-fixation method: 0,5ml of CSF samples from lumbar puncture are harvested directly in modified DURAClone IM Phenotype basic tubes (RUO, B53309), then a single drop of fixative solution containing 0,5% of formaldehyde is added. Stained tubes are then directly analyzed from 10-15min later to 3 days, on a Navios flow cytometer. They are compared to classical unfixed CSF samples stored at room temperature and processed at the same time points with the same one-step method.

Results:

A monocyte count decreased is observed in unfixed CSF samples from only one hour. Other leukocyte subsets are more stable than monocytes.

The simple addition of a fixative solution (final concentration of 0,033% of formaldehyde) is sufficient to preserve leukocyte proportions as well as antibody staining quality over 3 days at room temperature.

Discussion and Conclusion:

The decreased number of monocyte cell count observed needs to be investigated in more detail to determine whether it comes from cell death or cell adherence to the plastic container.

Overall, this preliminary proof of concept needs to be supplemented with more samples to statistically validate the drop in monocyte count and the fixed sample stability.

Nevertheless, the results show the fragility of immune cells within unprocessed CSF samples and the importance of a rapid analysis of CSF after harvesting. This one-step method could improve the overall workflow at the lab by providing a convenient delay between sampling collection and analysis without the risk of inaccurate results.

Références :

1. M. I. Del Principe, A. Gatti, U. Johansson, F. Buccisano, and B. Brando, 2021, "ESCCA/ISCCA protocol for the analysis of cerebrospinal fluid by multiparametric flow-cytometry in hematological malignancies," *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, vol. 100, no. 3, pp. 269–281.
2. R. W. Steele, D. J. Marmer, M. D. O'Brien, S. T. Tyson, and C. R. Steele, 1986, "Leukocyte survival in cerebrospinal fluid," *J Clin Microbiol*, vol. 23, no. 5, pp. 965–966.

Les cellules T CD4 régulatrices Eomes+ Foxp3+ infiltrent le système nerveux central pendant la neuro-inflammation et présentent des fonctions suppressives réduites et une plasticité accrue

R. Peroceschi¹ (romain.peroceschi@inserm.fr), A. Agesta¹, E. Joulia², A.-L. Le Dorze¹, I. Bernard¹, R. Barascud¹, A. Saoudi¹, A..S Dejean¹

¹ UMR1291, Infinity, Toulouse, France

² Salk Institute for Biological Studies, San Diego, États-Unis

Introduction et Objectifs :

L'activation des cellules T CD4 auto-réactives peut être réprimée par les cellules T Foxp3+ (Tregs), acteur majeur dans la tolérance et l'homéostasie immunitaire. Plusieurs études ont montré que les Tregs sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans les troubles inflammatoires du système nerveux central (SNC), y compris la sclérose en plaques (SEP), dans laquelle des défauts dans la fonction suppressive des Tregs associés à une plasticité accrue (sécrétion de cytokines inflammatoires) ont été signalés. Cependant, **les mécanismes contrôlant les fonctions suppressives des Tregs et la plasticité pendant la neuro-inflammation restent mal définis.**

Eomes est un facteur de transcription qui joue un rôle crucial dans la neuro-inflammation. En effet, les cellules CD4 Eomes+ s'accumulent chez des patients atteints d'une SEP secondaire progressive. Nos études récentes utilisant le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) ont montré qu'Eomes favorise le développement de l'EAE en contrôlant la survie et le métabolisme mitochondrial des cellules CD4 effecteurs. De manière intéressante, nous avons remarqué qu'une forte proportion des cellules CD4 Eomes+ infiltrant le SNC lors de l'EAE étaient des Tregs Foxp3+. Le but de notre étude est d'étudier **le rôle d'Eomes dans la fonction des Tregs au cours de la neuro-inflammation et de déchiffrer les mécanismes moléculaires en jeu.**

Matériels et Méthodes :

Pour étudier le rôle d'Eomes dans les fonctions et la plasticité des Tregs, des modèles de souris ont été développés pour suivre et purifier les Tregs exprimant Eomes (Foxp3-Thy1.1-Eomes-GFP) et les Tregs déficients en Eomes (Foxp3-Thy1.1-EomesTKO). Nous avons effectué une analyse phénotypique et fonctionnelle de ces Tregs Eomes+ au cours de l'EAE. Nous avons ensuite évalué leurs origines et fonctions *in vitro* et *in vivo* en utilisant des expériences de coculture et un modèle de transfert adoptif.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Nous avons montré que les Tregs Eomes+ proviennent des Tregs Foxp3+ naturels et s'accumulent dans le SNC au cours de l'EAE. De plus, nous avons montré que ces Tregs Eomes+ présentent une diminution de l'expression des marqueurs suppressifs associée à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules cytotoxiques. En utilisant une expérience de coculture, nous avons montré que les Tregs Foxp3+ Eomes+ présentent une capacité de suppression réduite par rapport aux Tregs normaux. *In vivo*, les Tregs Eomes+ présentent également des fonctions suppressives altérées après leur transfert adoptif dans des souris RAG2^{-/-}. L'analyse par séquençage de l'ARN a révélé que l'expression d'Eomes dans les Tregs est associée à une expression accrue des gènes impliqués dans la cytotoxicité, les cytokines inflammatoires, et à une diminution de l'expression des gènes associés à la signature des Tregs.

Ainsi, notre étude identifie une sous-population de Tregs Eomes+ s'accumulant dans le SNC enflammé, qui présente une diminution des fonctions suppressives et une plasticité accrue vers des fonctions effectrices. Le décryptage des mécanismes moléculaires d'action d'Eomes dans les Tregs pourrait mettre en évidence de nouveaux gènes cibles d'Eomes impliqués dans la régulation de l'identité, de la fonction et de la plasticité des Tregs au cours de la neuro-inflammation.

Contribution des neutrophiles à la pathogenèse de la sclérose latérale amyotrophique

C. Ritacco^{1,1} (caroline.ritacco@inserm.fr), V. Brugiotti¹, D. Challuau¹, T. Vincent², C. Raoul¹

¹ INM, INSERM, Montpellier, France

² Immunologie, CHU de Montpellier, Montpellier, France

Objectif :

Il existe aujourd'hui des preuves solides que l'inflammation chronique du système nerveux central (SNC) associée à une dérégulation du système immunitaire est impliquée dans la pathogenèse de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) [1]. L'infiltration de lymphocytes dans le cerveau et la moelle épinière, et leur implication dans la pathogenèse de la maladie ont été démontrés dans les modèles murins de la maladie et chez les patients atteints de SLA [2]. Une étude portant sur 1 030 patients atteints de SLA a montré qu'un rapport neutrophiles/lymphocytes plus élevé était associé à une progression plus rapide de la maladie et avait un effet négatif sur la survie [3]. Les neutrophiles représentent les leucocytes les plus abondants dans le sang, ils sont les initiateurs de la réponse inflammatoire et la première ligne de défense contre les agents pathogènes envahissants. Un des mécanismes de défense des neutrophiles est la nétose, c'est-à-dire la production d'un réseau extracellulaire de filaments d'ADN et de molécules antimicrobiennes appelé «Neutrophils extracellular Trap» (NETs) qui ont pour but d'emprisonner et d'éliminer les agents infectieux. Les neutrophiles et plus particulièrement les NETs ont été mis en cause dans la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires chroniques [4,5]. Cependant, le rôle des neutrophiles dans la SLA n'a jamais été étudié. Ici, nous étudions pour la première fois la contribution des neutrophiles et des NETs dans la physiopathologie de la SLA.

Méthodes :

Les neutrophiles ont été caractérisés par des analyses de cytométrie de flux dans le sang et la moelle épinière d'un modèle murin de SLA (souris SOD1^{G93A}) au stade asymptomatique, au début de la maladie et au stade symptomatique. Différentes sous-populations de neutrophiles sanguins ont été analysées par cytométrie en flux et comparées entre les patients atteints de SLA (n=15) et les contrôles sains (n=23).

Résultats :

Nous n'observons pas de différence significative dans la fréquence et le phénotype des neutrophiles dans le sang des souris SOD1^{G93A} par rapport aux souris contrôles (C57BL/6) du stade asymptomatique au stade terminal de la maladie. Cependant, nous avons mis en évidence une diminution de la fréquence des neutrophiles ainsi qu'un changement phénotypique avec une augmentation de l'expression de CD11b dans la moelle épinière des souris SOD1^{G93A} au stade terminal de la maladie. De plus, dans le sang des patients atteints de SLA, nous retrouvons une diminution de la fréquence des neutrophiles immatures et une augmentation de la fréquence d'une sous-population immunosuppressive CD16+CD10+CD49d-CD62L-.

Conclusion :

Les neutrophiles montrent un phénotype plus activé chez les souris SOD1^{G93A} au stade terminal de la maladie. Les patients atteints de SLA possèdent une sous-population de neutrophiles (CD16+CD10+CD49d-CD62L-) caractéristique d'un environnement inflammatoire. Les neutrophiles semblent donc jouer un rôle dans l'inflammation chronique qui survient au cours de la SLA.

Références :

1. Vahsen, Björn F et al. "Non-neuronal cells in amyotrophic lateral sclerosis - from pathogenesis to biomarkers." *Nature reviews. Neurology* vol. 17,6 (2021): 333-348. doi:10.1038/s41582-021-00487-8
2. Coque, Emmanuelle et al. "Cytotoxic CD8+ T lymphocytes expressing ALS-causing SOD1 mutant selectively trigger death of spinal motoneurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 116,6 (2019): 2312-2317. doi:10.1073/pnas.1815961116
3. Wei, Qian-Qian et al. "Neutrophil-to-lymphocyte ratio in sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Neural regeneration research* vol. 17,4 (2022): 875-880. doi:10.4103/1673-5374.322476
4. Castanheira, Fernanda V S, and Paul Kubes. "Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation." *Blood* vol. 133,20 (2019): 2178-2185. doi:10.1182/blood-2018-11-844530
5. Dong, Yuan et al. "Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression." *Annals of neurology* vol. 83,2 (2018): 387-405. doi:10.1002/ana.25159

Caractérisation de la réponse lymphocytaire T et B par cytométrie spectrale dans le rejet en transplantation rénale

K. Louis (kevs_louis@hotmail.com)

Université Paris Cité, Inserm U976, Paris, France

Malgré le développement et l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs, l'un des obstacles à la réussite d'une greffe rénale est représenté par l'activation de la réponse immunitaire adaptative qui peut conduire au développement d'anticorps spécifiques du donneur et au rejet de greffe. Les agents thérapeutiques pour traiter le rejet de greffe comprennent les corticostéroïdes et des agents déplaçant les lymphocytes T et B avec une efficacité insuffisante et n'empêche pas entièrement l'activation immunitaire et donc les dommages immunitaires du greffon rénal. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques lymphocytaires T et B constitue donc un besoin urgent pour développer des médicaments plus efficaces pour traiter le rejet de greffe. Notre approche consiste donc à utiliser la cytométrie spectrale haute résolution combinant plus de 20 marqueurs pour étudier les phénotypes lymphocytaires T et B des populations immunitaires circulantes chez les patients ayant reçu une greffe de rein. Nos résultats identifient l'accumulation de populations lymphocytaires spécifiques du rejet, avec un état d'activation, de différenciation et de fonctions effectrices distinctes qui les distinguent des populations lymphocytaires des patients sans rejet de greffe. Il existe une corrélation entre l'accumulation de populations effectrices T follicular helper et B mémoires, la perte des T régulateurs et la sévérité des lésions inflammatoires du greffon.

Ces résultats soulignent de nouvelles cibles immunitaires permettant d'envisager de cibler plus spécifiquement le système immunitaire et traiter plus efficacement le rejet de greffe de rein.

Références :

1. Louis K, Macedo C, Lefaucheur C, Metes D. Adaptive immune cell responses as therapeutic targets in antibody-mediated organ rejection. *Trends Mol Med.* 2022;28(3):237-250.
2. Louis K, Macedo C, Bailly E, et al. Coordinated Circulating T Follicular Helper and Activated B Cell Responses Underlie the Onset of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(10):2457-2474.
3. Louis K, Bailly E, Macedo C, et al. T-bet+CD27+CD21- B cells poised for plasma cell differentiation during antibody-mediated rejection of kidney transplants. *JCI Insight.* 2021;6(12):148881.

Les lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux : la pierre angulaire de la réponse aux immunothérapies par blocage des points de contrôle immunitaire

M. Ayyoub (maha.ayyoub@inserm.fr)

Centre de recherches en cancérologie de Toulouse, Université Toulouse 3 / Inserm / CNRS, Toulouse, France

L'immunothérapie par blocage des points de contrôle immunitaire (Immune checkpoint blockade, ICB) a transformé la prise en charge des patients en oncologie. En moins d'une décennie, les ICB ont été introduits dans le traitement de près de 20 types de cancer et sont devenus le traitement de première ligne pour des cancers jusqu'alors incurables, tels que le mélanome métastatique et le cancer bronchique.

Néanmoins, le bénéfice clinique des ICB n'est observé que dans une fraction des patients, environ 30 %. Cela a incité à rechercher des mécanismes de résistance dans le double but d'identifier des biomarqueurs de réponse et de développer des immunothérapies de nouvelle génération. La corrélation trouvée dans plusieurs études entre la réponse clinique aux ICB et l'infiltrat CD8 intratumoral, les signatures des lymphocytes T effecteurs ou la charge mutationnelle tumorale (TMB), a placé les lymphocytes T CD8 antitumoraux comme acteurs centraux du rejet thérapeutique des tumeurs. Ainsi, alors que l'identification des antigènes (Ags) tumoraux reconnus par les lymphocytes T a permis d'apprécier le rôle de l'immunité adaptative dans le contrôle des tumeurs, les ICB ont démontré que le rejet des tumeurs médié par l'immunothérapie est possible grâce à la mobilisation des lymphocytes T antitumoraux. Ce tournant indéniable dans la thérapie anticancéreuse a été consolidé par les succès cliniques récents des thérapies CAR-T et de transfert de cellules T transgéniques exprimant des TCR spécifiques de la tumeur et a (re)stimulé le développement de vaccins anticancer visant à renforcer la réponse immunitaire adaptative pour éliminer les cellules tumorales.

Nous avons analysé les réponses lymphocytaires T CD8 et CD4 aux Ags tumoraux appartenant à trois familles : les Ags « *cancer testis* » exprimés dans les cellules germinales et les tumeurs ; les néoantigènes codés par les mutations somatiques tumorales ; et les Ags des virus oncogènes, à savoir le HPV. Je présenterai nos données montrant l'interaction entre les réponses lymphocytaires T aux Ags tumoraux, l'épuisement des cellules T, la cible même des ICB, et les réponses cliniques aux ICB, ainsi que la contribution potentielle de nos résultats et de ceux d'autres groupes pour le développement des vaccins anticancer.

Modification de l'expression des Antigènes HLA-DR et CD64 des leucocytes humains par cytométrie en flux : marqueurs fiables de survenue du sepsis chez les patients en réanimation ?

S. Addakiri^{1,2} (saraaddakiri1995@gmail.com), H. Bencharef^{1,2}, S. Jaddaoui², K. Ait Ichou², B. Oukkache^{1,2}

¹ Faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca Université Hassan 2, Casablanca, Maroc

² Laboratoire d'hématologie CHU IBN ROCHD Casablanca, Casablanca, Maroc

Introduction :

Le sepsis est une affection potentiellement mortelle avec des taux de mortalité élevés. La détection précoce et le diagnostic précis sont essentiels pour une prise en charge efficace. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'expression des biomarqueurs HLA- DR dans les monocytes, CD64 dans les monocytes et les polynucléaires neutrophiles, ainsi que la protéine C-réactive (CRP), chez des patients nouvellement admis au service de réanimation du CHU Ibn Rochd.

Matériel et Méthodes :

Il s'agit d'une étude prospective effectuées sur des patients adultes nouvellement admis au service de réanimation du CHU Ibn Rochd et âgés de plus de 18 ans ont été inclus dans cette étude. Les prélèvements ont été réalisés en J0, J3 et J6 et les valeurs d'expressions de HLA-DR et CD64 ont été obtenus par un cytomètre en flux NAVIOS (BECKMAN COULTER) multiparamétrique (6 couleurs, 2 lasers) équipé du logiciel CXP. Les hémocultures et la mesure de CRP ont été réalisées respectivement dans le service de bactériologie et le service de biochimie du CHU Ibn Rochd. Les patients sepsis ont été comparés à deux autres groupes, un groupe témoin normal et un groupe de patients infectés.

Résultats :

Vingt sept patients ont été analysés avec un sex ratio de 1.4 dont l'expression des marqueurs HLA-DR était significativement plus faible chez le groupe sepsis par rapport au groupe témoin (en J3 et J6) et par rapport au groupe infecté aussi en J6. Et CD64 était aussi significativement plus faible par rapport aux deux autres groupes en J6. Pour nCD64 aucune différence significative n'a été enregistrée. La différence de CRP par rapport aux témoins était très significative, mais aucune différence significative n'a été observée par rapport aux patients infectés.

Conclusion :

Le marqueur HLA-DR est le meilleur biomarqueur pour la prédiction du sepsis. Bien que la CRP soit un marqueur excellent pour la détection d'une infection, mais elle ne parvient pas à différencier entre une infection normale et un cas de sepsis.

Références :

1. Agnello, L., Giglio, R. V., Bivona, G., Scazzone, C., Gambino, C. M., Iacona, A., Ciaccio, A. M., Lo Sasso, B., & Ciaccio, M. (2021). The Value of a Complete Blood Count (CBC) for Sepsis Diagnosis and Prognosis. *Diagnostics*, 11(10), 1881. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11101881>
2. Bae, M. H., Park, S. H., Park, C.-J., Cho, E.-J., Lee, B.-R., Kim, Y. J., Park, S. H., Cho, Y.-U., Jang, S., Song, D.-K., & Hong, S.-B. (2016). Flow cytometric measurement of respiratory burst activity and surface expression of neutrophils for septic patient prognosis. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 90(4), 368375. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21274>
3. Bullock, B., & Benham, M. D. (2022). Bacterial Sepsis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537054/>
4. Chen, G., Wen, D., Chong, H., Zhang, P., Du, J., Peng, G., He, Y., Zhang, K., Zhang, A., & Deng, J. (2022). [Value of peripheral blood monocyte subsets and CD64 expression in the diagnosis and prognosis of sepsis]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 34(9), 921926. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121430-20220711-00647>
5. Coberly, J., Johnson, C., & Hammer, R. (2015). Neutrophil CD64 by Flow Cytometry Has Excellent Negative Predictive Value for Excluding Sepsis. *American Journal of Clinical Pathology*, 144(suppl_2), A144. <https://doi.org/10.1093/ajcp/144.suppl2.144>

Leveraging whole blood-based functional flow cytometry assays to stratify and monitor rheumatoid arthritis patients

C. Cartagena García^{1,2} (CCARTAGENA@beckman.com), N. Balandraud^{2,3}, N. Lambert², J.-M. Busnel¹

¹ Beckman Coulter Life Sciences, Research Department, Marseille, France

² INSERM, UMRs 1097, Aix Marseille University, Marseille, France

³ AP-HM, Sainte Marguerite Hospital, Rheumatology Department, Marseille, France

Introduction and Objectives:

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease whose treatment is still not optimal nowadays, leading to inefficient therapeutic strategies and not enabling disease control/remission. To achieve a better patient stratification, novel tools are needed to achieve a more personalized medicine. After having developed a whole blood-based flow cytometry functional assay to characterize RA patients, we aimed to explore its capabilities for further patient stratification and monitoring after therapy administration according to 4 different clinical questions: the level of DAS28, the presence of joint erosion, the use of methotrexate (MTX) or anti-TNF α .

Material and Methods:

Samples of leftover blood tubes from RA patients visiting Sainte Marguerite Hospital AP-HM in Marseille were used upon informed consent. Only RA patients who were ACPA positive and fulfilled ACR/EULAR 2010 criteria were included. Patient sample collection was approved by the Committee of Protection of Persons (CPP) Sud-Méditerranée II (committee reference: 208 C10) and the services of the Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation under the identification number DC-2008-327. Patient health data access authorization has been listed under number PADS22-77.

At the time of sampling, 21 patients were recently diagnosed and did not have any DMARDs yet. Out of those, 14 patients were sampled several times (between 1 and 5 times) and followed longitudinally over a period of 27 months with a first sampling point at treatment initiation. The remaining 7 patients were already treated (either with MTX and/or anti-TNF) at the first sampling time, and 3 of the latter group were also longitudinally followed. Whole blood was initially activated with LPS alone or combined with an anti-TNF, infliximab (IFX). A no-wash protocol was implemented to simplify and streamline workflows. Activation marker expressions were measured using a 10-color flow cytometry panel in 6 different immune cell subsets.

Results and Conclusion:

After performing unsupervised analysis, we identified the most relevant parameters to discriminate patients according to the different clinical questions. The expression of CD54, CD16, CD11b on granulocytes and CD69 on T cells allowed partial patient clustering according to their DAS28 levels. We further identified potentially relevant biomarkers, such as CD16 on monocytes that increased upon early MTX treatment and then decreased after some months. We think it would be valuable to consider such whole blood assays further as they could open perspectives for pre-clinical translational research in the field of autoimmune inflammatory diseases.

Le Pexidartinib, un inhibiteur de CSF-1R, impacte la différenciation des cellules dendritiques en inhibant la signalisation de FLT3 chez les patients traités par anti-PDL-1 - résultats d'une étude de phase 1

C. Rodriguez¹ (celine.rodriguez@lyon.unicancer.fr), A. Voissière², A. N'kodia¹, C. Gomez-Roca³, S. Chabaud⁴, J. Berthet¹, I. Treilleux⁵, G. Garin⁴, C. Caux¹, B. Dubois², P. A. Cassier⁶, N. Bendriss-Vermare², C. Ménétrier-Caux¹

¹ Laboratoire d'Immunothérapie du Cancer de Lyon (LIICL), Centre Léon Bérard/CRCL, Lyon, France

² Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U-1052, CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), Lyon, France

³ Département d'oncologie médicale, Institut Claudius Régaud/Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncop, Toulouse, France

⁴ Département de recherche Clinique (DRCI), Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁵ Département de Biopathologie, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶ Département d'Oncologie médicale, Centre Léon Bérard, Lyon, France

Introduction et Objectifs :

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) dépendants de CSF-1 pour leur survie jouent un rôle essentiel dans la résistance aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICPi) tels que PD-1/PD-L1. L'élimination de ces TAM pro-tumoraux en inhibant CSF-1R permettrait d'améliorer les réponses aux anti-PD-L1. L'étude de phase I (MEDIPLEX, NCT02777710) a évalué la combinaison thérapeutique d'un Ac anti-PDL1 (Durvalumab) avec un inhibiteur de tyrosine kinase (TKI) ciblant CSF1-R (Pexidartinib), dans une cohorte de cancers métastatiques du pancréas et du colon (n=47). Un des objectifs de cette étude était le suivi longitudinal phénotypique et fonctionnel des différentes cellules immunitaires dans le sang afin d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse au traitement.

Matériel et Méthodes :

Le suivi longitudinal phénotypique et l'analyse fonctionnelle des différentes populations immunes dans le sang a été réalisée respectivement par cytométrie en flux et ELISA. Les facteurs solubles ont été quantifiés dans le plasma des patients par ELISA. La phosphorylation d'AKT (Ser473) a été analysée sur des DC de sang de donneurs sains par cytométrie en flux. L'impact fonctionnel du pexidartinib sur la différenciation de cellules dendritiques (DC) à partir de progéniteurs de moelle osseuse chez la souris a été analysé par cytométrie en flux.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Si aucune toxicité inattendue n'a été observée, seul un patient CRC MSI+ (2 %) a montré une réponse partielle tandis que sept patients (15 %) ont présenté une maladie stable.

Nous confirmons, au cours de traitement, une augmentation des niveaux de CSF-1 dans le plasma des patients et une diminution des proportions de monocytes CD14^{low}CD16^{high} circulants, démontrant l'activité du Pexidartinib. De façon inattendue, le traitement réduit significativement les proportions des sous-populations de DC dans le sang des patients et altère la production d'IFN- λ /IL-29 par les DC conventionnelles de type 1 après stimulation *in vitro* par un ligand de TLR3. Le Pexidartinib cible également c-KIT et FLT3, deux récepteurs clés des facteurs de croissance impliqués dans le développement et la maturation des DC. Le traitement par Pexidartinib, augmente les taux plasmatiques de FLT3-L chez les patients et inhibe *ex vivo* la phosphorylation d'AKT (Ser473) induite par FLT3-L dans toutes les sous-populations de DC circulantes. Nous avons également pu mettre en évidence chez la souris que le Pexidartinib altère la génération des sous-populations de DC murines dépendante de FLT3-L mais pas de GM-CSF à partir de progéniteurs de la moelle osseuse *in vitro*.

Nos résultats démontrent que le Pexidartinib, en inhibant la signalisation de FLT3, a un effet délétère sur la différenciation des DC ce qui pourrait expliquer l'absence de résultats cliniques observée avec cette combinaison thérapeutique. Ce travail pourrait donner des informations majeures pour l'utilisation future des TKI qui ciblent FLT3 en clinique humaine, notamment en association avec des inhibiteurs des ICP.

Long term cellular immune response persistence among COVID-19 vaccinated rheumatoid arthritis patients treated by Rituximab

P. Bourgoïn¹ (pbourgoïn01@beckman.com), J. Marin², N. Saverna¹, C. Cartagena Garcia¹, P. Lafforgue², J.-M. Busnel¹, N. Balandraud^{2,3}

¹ Beckman Coulter Life Sciences IMMUNOTECH, Marseille, France

² Rheumatology Department, Sainte Marguerite Hospital, Marseille, France

³ UMR 1097 INSERM, Aix Marseille University, Marseille, France

Background:

Humoral response induced by anti-SARS-CoV-2 mRNA vaccine is significantly lower or even absent in patients with inflammatory rheumatic diseases treated with anti-CD20 therapies such as Rituximab (RTX) than in those treated with cytokine therapies (e.g., anti-TNF or anti-IL6). However, a specific cellular immune response exists 1 or 2 months after vaccination. As cytotoxic T cells are considered as essential components of the antiviral defense arsenal, and since it is not clear when to do booster shots, analysis of the specific T response over the long term could be a useful decision-making tool.

Objectives:

This study aims to compare the spike-specific T-lymphocytes response in a cohort of Rheumatoid Arthritis (RA) patients under RTX or under other conventional synthetic or biological disease-modifying antirheumatic drugs (csDMARDs, bDMARDs). Our secondary goal was to assess the retention of this response up to 18 months after the last COVID boost (vaccine or infection).

Methods:

Our study cohort included 75 adult patients with ACPA positive RA, followed at the rheumatology department of Sainte Marguerite Hospital (Marseille, France). RA patients fulfilled the 2010 ACR/EULAR criteria for RA and had received at least two doses of SARS-COV-2 mRNA vaccine. Cellular immune response was assessed by flow cytometry. Briefly, 250 µL of whole blood were incubated per condition, including a negative control, CEFX peptides (mix of viral peptides) as a positive control, and Spike peptides. Marker expression was measured with a 3-laser 13-color CytoFLEX flow cytometer. CD69, CD154, CD137 and CD107a expressions were monitored to characterize LT4 or LT8 activation patterns.

Results:

51 RA patients treated with RTX (RTX RA) exhibited a lower mean humoral titer of 562 BAU/mL than 24 RA patients treated with other csDMARDs or bDMARDs (non RTX RA) having 839 BAU/mL ($p = 0.034$). However, all patients exhibited LT4 and LT8 spike-specific responses with a better LT8 response in RA RTX patients ($p < 0.001$).

RA patients treated with RTX maintained a specific LT4 and LT8 response against Spike peptides with no decrease up to 18 months after the last SARS-COV-2 boost (vaccine dose or COVID 19 infection).

Conclusion:

Even if RTX treatment prevented COVID vaccine to trigger humoral response in RA patients, strong spike-specific T lymphocyte-responses were exhibited and seemed to persist up to 18 months after the last COVID boost. Analyzing spike-specific T-cell response could be used in personalized medicine to decide when revaccination is necessary.

CD36 contribue au processus métastatique et à la rechute des leucémies aiguës myéloïdes

J. Nakhle (jean.nakhle@inserm.fr)

Restore Research Center, Université de Toulouse, INSERM 1301, CNRS 5070, EFS, ENVT, Toulouse, France

L'identification des mécanismes à l'origine des rechutes est un enjeu clinique majeur pour un traitement efficace du cancer. La compréhension émergente de l'importance des métastases dans les hémopathies malignes suggère qu'elles pourraient également jouer un rôle dans la résistance aux médicaments et les rechutes dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Dans une cohorte de 1273 patients atteints de LAM, nous avons découvert que l'expression du récepteur multifonctionnel CD36 était positivement associée à la dissémination extramédullaire des blastes leucémiques, à un risque accru de rechute après une chimiothérapie intensive et à une survie globale réduite. CD36 était inutile pour l'utilisation des lipides par les blastes mais favorisait leur migration grâce à sa liaison notamment avec la thrombospondine-1. Les blastes exprimant CD36, largement enrichis après la chimiothérapie, présentaient un phénotype similaire au vieillissement cellulaire tout en conservant leur capacité migratoire. Dans les modèles de xénogreffes de souris, l'inhibition de CD36 a réduit les métastases des blastes et prolongé la survie des souris traitées par chimiothérapie. Ces résultats ouvrent la voie au développement de CD36 en tant que marqueur indépendant de mauvais pronostic chez les patients atteints de LAM et en tant que cible prometteuse pour améliorer le traitement des LAM.

Références :

1. Farge*, Nakhle* et al., 2023, Cancer Research, 10.1158/0008-5472.CAN-22-3682.

Impact de l'immuno-senescence dans l'insuffisance rénale aiguë

S. Rao¹ (snigdha.rao@inserm.fr), M. Zahm², A. Casemayou³, M. Buleon³, S. Faguer³, G. Feuillet³, J. Iacovoni³, I. Gonzalez-Fuentes¹, O. P. Joffre², E. Lhuilleir¹, F. Martins¹, A. Zakaroff-Girard¹, J. Schanstra¹, J.-S. Saulnier-Blache¹, J. Bellière¹

¹ U1297, INSERM, Toulouse, France

² INSERM UMR1291–CNRS UMR5051, INSERM, Toulouse, France

³ INSERM U1297, INSERM, Toulouse, France

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est un état pathologique fréquente et grave, associé à un risque de développer une maladie rénale chronique (MRC). Bien que l'incidence et la morbi-mortalité de l'insuffisance rénale aiguë soient significativement plus élevées chez les personnes âgées que chez les patients plus jeunes, la susceptibilité élevée de la population âgée à l'insuffisance rénale aiguë n'a pas encore été entièrement expliquée. L'immunosénescence (IS) pourrait être le dénominateur commun entre l'IRA, l'IRC et le vieillissement. Alors qu'il est reconnu que l'IS peut survenir au cours du vieillissement et de l'IRC, nous avons émis l'hypothèse novatrice que l'IS pourrait également survenir au cours de l'IRA et que sa détection précoce et son blocage approprié pourraient avoir un impact sur le pronostic rénal. Comme nous avons déjà décrit le rôle des sous-types de macrophages dans l'IRA induite par la rhabdomyolyse (RM-IRA), nous avons souhaité explorer plus avant l'impact des cellules immunitaires dans l'IRA et étudier la présence de cellules immunitaires sénescentes au cours de l'insuffisance rénale aiguë.

Nous avons réalisé une expérience de Single-cell RNASeq chez des jeunes souris soumises à une IRA après RM (modèle d'injection intra-musculaire de glycérol). L'expression génique des cellules CD45+ triées à partir des reins de souris a été possible grâce à la technologie 10X.

Le regroupement non supervisé de près de 17 000 transcriptomes unicellulaires a permis d'identifier 7 groupes de cellules immunitaires connus. Le sous clustering des cellules phagocytaires mononucléaires (MPC) comprenant les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, a révélé 9 sous-populations cellulaires distinctes. Un cluster de macrophages était particulièrement intéressant car il se comportait comme un point critique dans une trajectoire de reprogrammation transcriptionnelle. Étant donné que ce cluster exprimait des gènes caractéristiques de la sénescence, l'effet d'un traitement sénolytique combiné dasatinib/quercétine (DQ) a été évalué. Le traitement par DQ a amélioré la fonction rénale et modifié le phénotype des MPC étudié en cytométrie.

La technique de scRNA-seq a permis d'identifier de nouveaux sous-types myéloïdes après RM-IRA dans le rein, et a démasqué une population transitoire de macrophages affectée par les processus de sénescence cellulaire. Ce travail apporte la preuve de concept que l'immunosénescence se produit au cours de l'IRA et que les sénolytiques sont des médicaments néphroprotecteurs potentiels.

Caractérisation de la neuroinflammation et des modulations phénotypiques de la microglie au cours de la maladie de Parkinson par cytométrie en flux

M. Prime (morgane.prime@inserm.fr), A.-L. Iscache, A.-L. Le Dorze, A. Dejean, S. Fruchon, M. Szelechowski

Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires (Infinity), INSERM UMR1291, CNRS UMR5051, Université Toulouse III, Toulouse, France

Introduction et Objectifs :

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative s'inscrivant dans un contexte inflammatoire chronique. Le ciblage des seuls neurones n'ayant pas permis jusqu'alors de traitement curatif efficace, de nombreuses études tendent aujourd'hui à comprendre et moduler la neuroinflammation. En effet, de nombreux acteurs immunitaires contribuent à la progression de la maladie, aussi bien des cellules résidentes du cerveau (microglie, astrocytes, macrophages associés aux bordures du cerveau) que des cellules de la périphérie infiltrant le parenchyme cérébral (lymphocytes T CD4 et CD8, macrophages, monocytes, granulocytes). Afin de caractériser la nature précise de ces acteurs aux différents stades d'évolution de la pathologie ainsi que leurs caractéristiques phénotypiques (prolifération et activation), nous avons mis en place de larges panels de marqueurs cellulaires détectables par cytométrie en flux à haut débit, dans un modèle murin de la MP.

Matériels et Méthodes :

Nous modélisons la MP chez la souris par injections répétées de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), neurotoxine ciblant principalement les neurones dopaminergiques. Nous avons déterminé plusieurs temps d'intérêt après intoxication (avant, pendant et après la mort neuronale), puis nous avons standardisé un panel de 20 marqueurs au BD FACSymphonyTM permettant de caractériser les différentes populations inflammatoires présentes.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Nous avons observé une mort neuronale progressive dans la substance noire, concomitante avec une infiltration de populations cellulaires inflammatoires (lymphocytes, monocytes, granulocytes, macrophages et cellules dendritiques). Nous avons également observé un changement de l'état d'activation de sous populations microgliales au cours du temps, et différent selon la région cérébrale analysée (cortex, striatum ou substance noire).

Nous savons que la microglie joue des rôles majeurs, à la fois dans la mise en place de la neuroinflammation et dans l'accélération de la mort neuronale en phase tardive. Néanmoins, la microglie peut avoir des fonctions très variées, souvent simultanées et parfois opposées. Un grand nombre de marqueurs cellulaires permettent d'évaluer ces fonctions. Afin de pouvoir proposer des interventions ciblées sur les sous populations délétères, nous souhaitons aujourd'hui établir le phénotype précis de la microglie avant, pendant et après cette neurodégénérescence grâce à un nouveau panel de cytométrie regroupant 23 marqueurs d'activation microgliale.

Vers l'automatisation de l'analyse post-clustering

E. Lohmann (eugenie.lohmann@inserm.fr), Adrien Mazuel, Samuel Granjeaud

CRCM, INSERM, Marseille, France

Introduction et Objectifs :

Les avancées technologiques en cytométrie ont considérablement élargi la palette de marqueurs disponibles, ouvrant ainsi la voie à l'identification et à la caractérisation de nombreuses populations cellulaires ou états cellulaires différents. Ces progrès ont également permis d'analyser des échantillons de taille variable tout en standardisant les procédures.

La cytométrie est désormais capable de mesurer un panel de plusieurs dizaines de marqueurs sur chaque cellule dans le cadre d'expériences portant sur quelques dizaines ou centaines d'échantillons d'environ un million de cellules. Pour gérer ces volumes de données, des méthodes bien établies telles que la réduction de dimension, qui crée une carte bidimensionnelle des cellules synthétisant de manière optimale plusieurs dizaines de marqueurs, et le clustering, qui regroupe efficacement les cellules en quelques dizaines de clusters, ont été développées. Ces méthodes permettent une analyse précise des cellules ainsi que la quantification de l'abondance et de l'intensité médiane de chaque marqueur.

Ces informations sont cruciales pour comparer différentes conditions expérimentales ou cliniques et identifier les clusters présentant des variations significatives. Cependant, les méthodes actuellement disponibles pour cette identification sont souvent limitées, reposant souvent sur des logiciels statistiques inadaptés à l'automatisation, rendant complexe la création d'une liste de clusters candidats, notamment lorsqu'il s'agit d'établir un score combinant de manière optimale plusieurs informations.

Matériel et Méthodes :

Afin de passer rapidement des clusters à une liste de candidats ou à un score, nous avons développé AnalytiCyte, une application permettant de générer des rapports automatisés et standardisés, paramétrés en fonction de la comparaison souhaitée. Grâce à l'interface R Shiny, les utilisateurs peuvent effectuer des analyses post-clustering de manière autonome.

AnalytiCyte facilite également la détection d'échantillons ou de marqueurs présentant un comportement atypique grâce à des rapports de contrôle de qualité. Cette fonction inclut notamment des analyses en composante principale (PCA) qui identifient des valeurs extrêmes indépendamment de l'effet du lot. Cette approche robuste contribue à garantir la qualité des données et à identifier des événements rares ou inhabituels.

Une des visualisations générées par AnalytiCyte est la double heatmap, qui associe l'abondance et l'intensité médiane de chaque marqueur. Cette heatmap offre une visualisation claire permettant d'identifier visuellement les clusters dont l'abondance varie entre des conditions expérimentales, tout en déterminant le type des cellules qui les composent.

Les rapports d'analyse produits par AnalytiCyte permettent de croiser les résultats de plusieurs méthodes pour mettre en évidence les résultats les plus robustes. La solution supporte l'exportation de données depuis OMIQ et FlowJo, ainsi que l'importation de données depuis des feuilles de calcul Excel.

Résultats, Discussion et Conclusion :

AnalytiCyte fournit rapidement des résultats exploitables aux plateformes de cytométrie et aux expérimentateurs, simplifiant leur travail et leur permettant d'effectuer des analyses plus approfondies.

Identification d'effets de lot et contrôle visuel de qualité d'échantillons de cytométrie par *CytoMDS*, un nouvel outil de visualisation en basses dimensions des distances entre échantillons 'single cell'

P. Hauchamps¹ (philippe.hauchamps@uclouvain.be), D. Lin², L. Gatto¹

¹ *Biologie Computationnelle et Bio-informatique, Institut de Duve / UCLouvain, Bruxelles, Belgique*

² *Vaccine Research & Translational Statistics, GSK, Rixensart, Belgique*

Introduction et Objectif :

Le contrôle de qualité d'échantillons est un élément essentiel préalable à toute analyse de données de cytométrie. Notamment, l'identification de potentiels effets de lot est importante afin d'éviter de confondre ces effets avec des différences biologiques entre groupes d'échantillons. Cependant, cette tâche peut s'avérer délicate et fastidieuse, particulièrement dans le cas de grands jeux de données cliniques de dizaines, voire de centaines d'échantillons. Une idée consisterait à visualiser une topographie de l'ensemble des échantillons par une représentation en basses dimensions, en utilisant des techniques similaires à l'analyse en composantes principales, mais un défi réside dans l'adaptation de ce type de méthode à des données 'single cell', telles que les données de cytométrie.

Méthodes :

Afin d'adresser ce défi, une nouvelle méthode de visualisation en basses dimensions d'un ensemble d'échantillons 'single cell' a été développée dans un package R, *CytoMDS*. Cette méthode combine, d'une part, le calcul de distances entre paires d'échantillons grâce au concept d'*Earth Mover's Distance* [1], et, d'autre part, l'algorithme de projection MDS (*Multi Dimensional Scaling*) [2]. En complément, des outils graphiques de diagnostic de la qualité de projection, ainsi que d'aide à l'interprétation des axes de projection, sont également fournis au sein du package.

Résultats, Discussion et Conclusion :

L'utilisation de *CytoMDS* pour l'analyse de données de cytométrie est démontrée sur deux jeux de données réels. Dans un premier cas, la visualisation en deux dimensions des distances entre échantillons permet d'identifier rapidement un problème de qualité présent sur un sous-ensemble d'échantillons. Dans un second cas, un effet de lot lié à la date d'acquisition des données et une séparation entre les différentes conditions du schéma expérimental apparaissent, indiquant l'existence de différences biologiques entre ces groupes d'échantillons. Ces deux exemples démontrent l'utilité de *CytoMDS* qui permet une analyse exploratoire visuelle de l'ensemble des échantillons constituant un jeu de données expérimentales, facilitant le contrôle de qualité.

CytoMDS est disponible en 'open source' sur un répertoire GitHub et sera soumis prochainement pour intégration au sein du projet Bioconductor.

Références :

1. Haidong Yi and Natalie Stanley. 2022. "CytoEMD: Detecting and Visualizing between-Sample Variation in Relation to Phenotype with Earth Mover's Distance." In Proceedings of the 13th ACM International Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Health Informatics, 1–14. BCB '22 28. New York, NY, USA: Association for Computing Machinery.
2. Jan de Leeuw and Patrick Mair. 2009. "Multidimensional Scaling Using Majorization: SMACOF in R." *Journal of Statistical Software* 31 (3): 1–30.

26^e CONGRÈS ANNUEL DE L'ASSOCIATION FRANÇAISE DE CYTOMÉTRIE

15-17 novembre



CYTOMÉTRIE 2023



Centre de Congrès Pierre Baudis TOULOUSE

RÉSUMÉS DES COMMUNICATIONS

VENDREDI 17 NOVEMBRE



The accumulation of NK cells with adhesion defects and limited cytotoxic functions is associated with a poor prognosis in Multiple Myeloma

L. Martinet^{1,2} (Ludovic.martinet@inserm.fr)

¹ Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France

² Institut Universitaire du Cancer, CHU Toulouse, Toulouse, France

Promising results obtained with immunotherapeutic approaches for Multiple myeloma (MM) call for a better understanding of immune components in MM patients. These include in priority cytotoxic lymphocytes important for myeloma surveillance and therapy such as Natural Killer (NK) cells. In this study, we performed single cell RNAseq and spectral flow cytometry analysis of NK cells from MM and age/sex healthy donors (HD) that revealed important changes in NK cell landscape. Mature cytotoxic 'CD56dim' NK cells were reduced in MM patients at the advantage of late pseudotime NK cell clusters expressing NFkB and IFN-I signature genes. These 'inflamed' NK cells that accumulated in MM were characterized by a low CD16 and CD226 expression, had adhesion defects as well as reduced effector functions. Analysis of bone marrow infiltrating NK cell in a retrospective cohort of 177 MM patients demonstrated that a higher frequency of CD16/CD226 negative NK cells correlated with a reduced clinical outcome suggesting that accumulation of NK cells with limited effector functions may favor MM patients' therapeutic resistance. A better understanding of MM associated factors responsible for the accumulation of late stage dysfunctional 'inflamed' NK cells described in this study may allow the development of more efficient immunotherapy against MM.

Tertiary lymphoid structures are associated with enhanced macrophage and dendritic cell activation and proximity to CD8+ T cells, which better predict the clinical outcome of cervical cancer patients

L. Gorvel¹ (laurent.gorvel@inserm.fr), M. Panouillot², M.-S. Rouvière³, S. Fattori¹, N. Boucherit³, A. Ben Amara³, O. Quilichini⁴, S. Granjeaud⁵, X. Carcopino⁶, E. Lambaudie⁴, A.-S. Chretien³, R. Sabatier⁷, M.-C. Dieu-Nosjean², D. Olive¹

¹ Tumor Immunology, CRCM, Marseille, France

² Immune Microenvironment and Immunotherapy, Cimi, Marseille, France

³ Immunomonitoring platform, CRCM, Marseille, France

⁴ Department of Surgical Oncology, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

⁵ Integrative Bioinformatics Platform, CRCM, Marseille, France

⁶ Department of Obstetrics and Gynecology, APHM-Hopital Nord, Marseille, France

⁷ Predictive Oncology Laboratory, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

Cervical tumors are usually treated using surgery, chemotherapy, and radiotherapy, and would benefit from immunotherapies. However, the immune microenvironment in cervical cancer remains poorly described. Tertiary lymphoid structures (TLS) were recently described as markers for better immunotherapy response and overall better prognosis in cancer patients. We integratedly evaluated the cervical tumor immune microenvironment, and specifically TLS importance, using combined high-throughput phenotyping, soluble factor dosage, spatial interaction analyses, and statistical analyses. We demonstrate that TLS presence is associated with a more inflammatory soluble microenvironment, with the presence of B cells as well as more activated macrophages and dendritic cells (DCs). Furthermore, this myeloid cell activation is associated with expression of immune checkpoints, such as PD-L1 and CD40, and close proximity of activated conventional cDCs to CD8+ T cells, therefore indicating better immune interactions and tumor control. Finally, we associate TLS presence, greater B cell density, and activated DC density to improved progression-free survival, and present it as an independent prognostic marker. To conclude, our results provide an exhaustive depiction of the cervical tumor immune microenvironment where TLS presence marks cell activation and immunotherapy target expression. These findings may provide predictive clues for patient response to targeted immunotherapies.

Références :

1. Laurent Gorvel, 2023.08.17, bioRxiv .552583; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.08.17.552583>
2. Gorvel L, Olive D. *Semin Immunol.* 2023 Jan;65:101671. doi: 10.1016/j.smim.2022.101671. Epub 2022 Nov 29. PMID: 36459926.
3. Ruffin AT, et al. *Nat Commun* 12, 3349 (2021).
4. Helmink BA, et al. *Nature* 577, 549-555 (2020).
5. Dieu-Nosjean MC. *Adv Exp Med Biol* 1329, 51-68 (2021).

43 parameters for deep phenotyping of blood mononuclear cells, using specific features of spectral technology

S. Schmutz¹ (sandrine.schmutz@pasteur.fr), P.-H. Commere¹, N. Montcuquet², A. Cumano¹, C. Ait-Mansour², M. Hasan¹, S. Novault¹

¹ Institut Pasteur, Paris, France

² Sony Biotechnology, Paris, France

The analytical capability of flow cytometry is crucial for differentiating the growing number of cell subsets found in human blood. This is important for accurate immunophenotyping of patients with few cells and a large number of parameters. Here, we present the findings of a 43-parameter panel to analyze peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals using 41 fluorescently labelled monoclonal antibodies, an autofluorescent channel, and a viability dye. In different technical and biological replicates, we demonstrate minimal population distortions that lead to optimized population identification and reproducible results. The essential components of this analysis are: 1. Careful antibody panel assembly with similarity indices between fluorochromes less than 0.85; 2. Appropriate autofluorescence identification with integration in the unmixing matrix, allowing for an increase in the parameters to be analyzed and reduction of the autofluorescent signal in the fluorescent stainings, allowing true fluorescence detection; and 3. For such large panel, the addition of one laser that did not have an assigned fluorochrome decreased fluorescence spillover in the two-by-two plots with an improved discrimination of cell subsets and increased staining index, only when autofluorescence is integrated in the matrix.

We conclude that spectral flow cytometry is the most valuable tool for high-end immunophenotyping, although available technologies such as mass cytometry and imaging flow cytometry may provide complementary information for certain applications.

Simplifying High-Parameter Phenotypic and Functional Characterization of Cancer Immune Cells

E. Gregori (emilie.gregori@standardbio.com)

Standard BioTools, Paris, France

Interrogating immune cell composition and function in patients with cancer is critical for making disease prognoses, monitoring clinical efficacy of tumor immunotherapies, identifying novel therapeutic targets, and discovering predictive biomarkers of disease. Both the adaptive and innate arms of the immune system play important roles in generating pro- or anti-tumor milieus. Effector cells such as NK cells and T cells can directly kill tumor cells via secretion or cell-surface expression of cytolytic proteins and modulate the immune response through costimulatory molecules.

In multiple myeloma, malignant plasma cells accumulate in the bone marrow through clonal expansion, crowding out other cells and leading to anemia, renal insufficiency, immunosuppression, and increasing risk of multisystem organ damage if untreated. Cellular and antibody-mediated immunotherapeutic approaches, including CAR T cells and monoclonal antibodies targeting CD38, have been developed to treat multiple myeloma. Since NK cells can also indirectly impact CAR T cell or antibody-based immuno-therapies, characterizing these cells using optimized and reproducible assays is critical.

CyTOF® is a high-plex flow cytometry technology that uses metal-isotope-tagged antibodies to probe cellular phenotypes and functions. In contrast to fluorescence-based conventional and spectral flow cytometry, CyTOF experimental workflows are streamlined because autofluorescence is not an issue and signal spillover is minimal, allowing rapid design and application of 40-plus-marker panels. To expand on the increasing utility of the 30-marker Maxpar® Direct™ Immune Profiling Assay™ (Maxpar Direct Assay), we developed 9 add-on Expansion Panels for deeper phenotyping of specific cell types and activation states, including panels designed to characterize ex vivo and activated myeloid cells,

T cells, and NK cells. Here we demonstrate combining the Maxpar Direct Immune Profiling Assay with the NK Cell Expansion Panel (CD181, NKp30, NKp46, PD-1, NKG2A, ICOS, and TIGIT) or the T Cell Expansion Panel 3 (OX40, TIGIT, CD69, PD-1, Tim-3, ICOS, and 4-1BB) with the Basic Activation Expansion Panel (IL-2, TNF α , IFN γ , CD107a, perforin, granzyme B) to enable deep immunoprofiling of multiple myeloma PBMC.

Références :

1. Witzig, T. E. et al. "Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry." *Cytometry* 26 (1996): 113–120.
2. Kumar, S. et al. "Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders." *Best Practice & Research Clinical Haematology* 23 (2010): 433–451.
3. Ahn, E. et al. "Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (2018): 4,749–4,754.
4. Benson, D.M. et al. "The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody." *Blood* 116 (2010): 2,286–2,294.

Nouvelle approche de microfluidique basée sur l'utilisation de doubles émulsions, la cytométrie et la microscopie automatisée pour la métagénomique fonctionnelle et la culturomique

S. Lajus¹ (lajus@insa-toulouse.fr), A. Dagkesamanskaya¹, D. Lestrade², R. Flores-Flores³, G. Potocki-Veronese¹

¹ INSA de Toulouse, Toulouse Biotechnology Institute, Toulouse, France

² Toulouse White Biotechnology, Toulouse, France

³ I2MC INSERM, Toulouse, France

La recherche de nouvelles activités est essentielle en biotechnologies afin de découvrir mais aussi d'améliorer des fonctions enzymatiques et microbiennes. A ces fins, les écosystèmes microbiens représentent une véritable mine d'or. Néanmoins, la grande majorité des microorganismes (bactéries, levures, champignons) qui composent ces écosystèmes ne sont pas cultivables et sont même inconnus, ce qui les rend difficile, voire très souvent impossible à étudier.

L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux procédés de criblage à très-haut débit pour prospecter ces écosystèmes pour la découverte de souches ou d'activités par métagénomique fonctionnelle et culturomique, mais aussi pour l'ingénierie de souches et d'enzymes.

Pour cela, nous avons combiné diverses techniques :

- La microfluidique en gouttes qui permet la compartimentalisation de microorganismes individuels dans des gouttes de quelques picolitres,
 - La microscopie confocale pour de faire une sélection positive des microorganismes présentant une ou plusieurs activités d'intérêt avec un procédé automatisé d'identification et de sélection des gouttes « positives »,
 - La cytométrie en flux, afin de trier à très haut débit les gouttes « positives » et enfin d'isoler les clones d'intérêt.
- Ainsi, nous avons développé deux nouveaux procédés, qui ne sont pas basés sur l'utilisation de souches microbiennes fluorescentes ou de substrats fluorescents. Ces technologies sont exploitables pour la découverte de nouvelles espèces microbiennes ou de consortia et la découverte ou l'amélioration de nouvelles activités enzymatiques et de voies métaboliques.

Les preuves de concept de ces approches ont été établies en utilisant des banques métagénomiques issues du microbiote de mammifères, en particulier du colon humain, visant à mieux comprendre les interactions microbiote-hôte-alimentation médiées par les glycosides.

Intérêt de la cytométrie en flux pour l'étude de l'interface immunitaire-fongique

A. Moreno-Sabater (alicia.moreno-sabater@sorbonne-universite.fr)

Parasitologie-Mycologie, Sorbonne Université-APHP, Paris, France

L'impact du mycobiote intestinal dans la santé humaine et son implication dans les maladies auto-immunes et inflammatoires est maintenant clairement établi. Cependant les mécanismes qui contrôlent l'interface immunitaire-fongique restent à élucider. Les réponses immunitaires humorales permettent de refléter les relations dynamiques entre le mycobiote intestinal et l'immunité. Dans ce contexte, des méthodes de cytométrie en flux ont été développées pour caractériser ces réponses aux champignons commensaux. Cette technologie a l'avantage de permettre l'étude du champignon dans sa structure native (spore ou forme filamenteuse) et son interaction avec les immunoglobulines de l'hôte, fournissant ainsi une détermination fiable de l'exposition humaine. Elle nécessite des quantités infimes de sérum et de cibles fongiques, permettant ainsi l'analyse d'une grande diversité d'espèces fongiques. En travaillant avec cette technologie, il a été constaté qu'au niveau de la réponse humorale systémique, les IgG anti-commensales présentaient une forte variabilité interindividuelle chez les individus sains, avec une corrélation positive et significative lorsque la variété de ces réponses et l'alpha-diversité du mycobiote intestinal sont associées (1). En termes de réponses IgA homéostatiques anti-commensaux, la caractérisation du répertoire intestinal, systémique et maternel a révélé des réponses spécifiques, avec des répertoires ciblant différentes combinaisons de genres fongiques. La cytométrie en flux a également permis d'analyser *ex-vivo* l'opsonisation du mycobiote intestinal par des IgA sécrétoires chez des individus sains et des patients déficients en IgA (SIgAd) (2). En contraste avec le rôle major des IgA dans l'homéostasie des commensaux intestinaux, chez les patients SIgAd, il a seulement été observé une prolifération de *Candida albicans*, une levure commensale pathobionte, fréquemment décrite dans le mycobiote humain. L'opsonisation *ex-vivo* du mycobiote intestinal par les IgM a révélé le rôle compensatoire de cette immunoglobuline, qui permettrait ainsi de préserver l'écologie intestinale fongique chez les patients SIgAd, à l'exception de *C. albicans*. En conclusion, la cytométrie en flux permet une mesure simple et fiable des réponses humorales personnalisées contre les champignons commensaux. La combinaison de cette technologie avec des technologies du séquençage va permettre d'améliorer la connaissance des mécanismes régulant l'interface immunitaire/fongique et le développement de nouvelles thérapies.

Références :

1. Moreno-Sabater A, et al., 2020. Microbiome. Nov 15;8(1):159.
2. Moreno-Sabater A, et al., 2023. J Allergy Clin Immunol. Sep;152(3):748-759.e3.

Détection et quantification de levures d'altération du vin (*Brettanomyces*) par une méthode couplant séparation immuno-magnétique et cytométrie

D. François (contact@amarokbiotech.com), L. Dubois, V. Genty

Amarok Biotechnologies, Saint-Malo, France

Introduction et Objectif :

Comme la plupart des procédés alimentaires, la vinification présente des risques de contamination par une flore d'altération et nécessite donc de réaliser un suivi microbiologique régulier.

Les levures du genre *Brettanomyces* font partie des microorganismes d'altération les plus répandus, à cause de leur résistance au milieu stressant que constitue le vin (acidité, présence d'alcool et de sulfites...). Le développement des *Brettanomyces* peut gâcher le meilleur des crus par leur capacité à produire des phénols volatils à partir de précurseurs présents dans le raisin. Les œnologues ont donc besoin d'une méthode de détection rapide pour appliquer au plus tôt un traitement en cas de contamination.

Matériels et Méthodes :

Une méthode d'immuno-cytométrie développée en 2015, utilisant les premiers anticorps spécifiques aux *Brettanomyces* permet actuellement de répondre à cette problématique. Cependant le vin représente une matrice liquide relativement complexe à analyser en cytométrie à cause de la présence de pigments colorés ou fluorescents, qui peuvent créer un important bruit de fond.

Des travaux ont été menés afin d'améliorer la méthode en la basant sur une technique de séparation immuno-magnétique.

Le principe consiste à coupler de manière covalente les anticorps à des billes magnétiques micrométriques, puis à les incuber avec l'échantillon de vin dans des conditions optimales à la fixation anticorps-antigène. L'application d'un champ magnétique à l'aide d'un portoir aimanté permet de séparer les complexes billes-anticorps-*Brettanomyces* du reste de l'échantillon. Une étape de lavage par un tampon légèrement stringent élimine ensuite les cellules fixées de manière non spécifique aux billes ainsi que les particules issues du vin. Un marqueur de viabilité est enfin ajouté afin de quantifier par cytométrie en flux les *Brettanomyces* actives, qui constituent un risque pour la vinification.

Résultats, Discussion et Conclusion :

L'amélioration de la méthode permet ainsi d'isoler physiquement les *Brettanomyces* des autres levures tout en conservant un temps d'analyse inférieur à une heure. L'avantage par rapport à la méthodologie précédente est le retrait de la matrice vin et des autres levures avant analyse, ce qui permet d'abaisser le seuil de détection et de faciliter l'interprétation des données dans le cas de vins chargés en particules.

Analyse de la réponse immune systémique et mucoale anti-probiotiques

C. Gonnin¹ (cecile.hubert@aphp.fr), C. Parizot¹, K. Dorgham², S. Holowacz³, G. Gorochov⁴, D. Scalbert-Sterlin⁴

¹ Département d'Immunologie, La Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

² CIMI-Paris, INSERM U1135, Paris, France

³ Pileje Laboratoire, Paris, France

⁴ Département d'Immunologie, La Pitié-Salpêtrière, Sorbonne Université, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France

Le microbiote intestinal humain est un véritable défi pour le système immunitaire. Les immunoglobulines (Ig) A et G sont connues pour jouer un rôle crucial dans l'homéostasie de cet environnement [1]. Actuellement, la commercialisation de probiotiques connaît un succès croissant, apparaissant comme une solution à la dysbiose impliquée dans des maladies variées telle que le cancer, l'obésité ou les maladies auto-immunes. Dans ce projet, nous étudions la réponse immunitaire vis-à-vis de souches de probiotiques commercialisées (PiLeJe Laboratoire). La reconnaissance des souches de probiotiques par les IgG sériques, reflet de l'immunité systémique, et les IgA du lait maternel, reflet de l'immunité mucoale, a été évaluée en cytométrie en flux bactérienne selon un protocole publié[2]. Une analyse des sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) et d'IgA (IgA1 et IgA2) impliquées dans cette reconnaissance a ensuite été réalisée.

Nous avons observé un profil de reconnaissance variable selon les souches de probiotiques, au niveau systémique et mucoal. Parmi les IgA du lait maternel, les IgA1 et les IgA2 se fixent de façon équivalente aux bactéries probiotiques. Nous avons montré pour la première fois que les souches de probiotiques commercialisées étaient ciblées par notre système immunitaire comme le sont les bactéries composant notre microbiote[3]. Il sera intéressant de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de cette reconnaissance.

Références :

1. Sterlin et al., 2020, The Antibody/Microbiota Interface in Health and Disease.
2. Moor et al., 2016, Analysis of Bacterial-Surface-Specific Antibodies in Body Fluids Using Bacterial Flow Cytometry.
3. Fadlallah et al., 2019, Synergistic Convergence of Microbiota-Specific Systemic IgG and Secretory IgA.

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies plaquettaires

La cytométrie en flux : une technique de routine pour le phénotypage des plaquettes sanguines en clinique

S. Séverin¹ (sonia.severin@inserm.fr), C. Garcia^{1,2}, E. Riant¹, A. Zakaroff-Girard¹, A. Ribes^{1,2}, B. Payrastre^{1,2}

¹ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Inserm U1297, Toulouse, France

² Laboratoire d'Hématologie, Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse Rangueil, Toulouse, France

Introduction et Objectifs :

Les plaquettes jouent un rôle central dans l'hémostase et la thrombose : en réponse à divers agonistes matriciels ou solubles, elles concentrent un réseau régulé et complexe de voies de signalisation en aval de multiples récepteurs membranaires. Pour la pratique clinique, l'identification par Western blot d'anomalies de ces acteurs intracellulaires ou membranaires est très limitée en raison des volumes de sang déraisonnables et non justifiés ainsi que des délais de rendu des résultats. Le recours à une technique rapide à partir d'un échantillon de sang unique constitue l'enjeu d'un phénotypage plaquettaire exhaustif.

Matériels et Méthodes :

Par cytométrie en flux multicanaux et à l'aide d'anticorps commerciaux spécifiques, nous avons développé des approches innovantes i) d'analyse de l'expression de glycoprotéines de surface et de récepteurs membranaires, ii) d'identification de marqueurs d'activation et de sécrétion plaquettaires et iii) de caractérisation des protéines d'intérêt impliquées dans les voies de signalisation intraplaquettaires en aval des principaux récepteurs membranaires.

Résultats, Discussion et Conclusion

La cytométrie en flux uni et multicolore constitue une approche incontournable pour le phénotypage rapide à grande échelle des principales protéines plaquettaires à des fins cliniques, notamment lorsque les volumes d'échantillon ou la numération plaquettaire peuvent être critiques.

Références :

1. Multicolor flow cytometry in clinical samples for platelet signaling assessment. Garcia C, Dejean S, Savy N, Bordet JC, Series J, Cadot S, Ribes A, Voisin S, Rugeri L, Payrastre B, Sié P. Res Pract Thromb Haemost. 2023 May 16;7(4):100180.

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies plaquettaires

Intérêts et application de la cytométrie en flux pour l'analyse des plaquettes et de la mégacaryopoïèse

L. Gelon (lucie.gelon@ipbs.fr), E. Naser, E. Lefrançais

IPBS, Toulouse, France

La cytométrie en flux permet l'analyse individuelle des cellules et nous permet d'identifier, quantifier et caractériser les plaquettes ainsi que les cellules dont elles sont issues, les mégacaryocytes.

En plus de leur numération dans le sang, la moelle osseuse ou d'autres tissus dans lesquelles nous les retrouvons (poumon, rate,...), la cytométrie permet, grâce à l'expression d'antigènes membranaires et grâce au contenu en ARN ou en ADN, une analyse détaillée de leurs caractéristiques physiques (taille, structure) et biologiques (expressions des intégrines, récepteurs, marqueurs d'activation,...). La cytométrie permet également de tester les caractéristiques fonctionnelles des plaquettes (dégranulation, adhésion, agrégation, ...) grâce notamment à l'utilisation de substrats fluorescents.

Nous avons ainsi mis en place un panel d'anticorps en cytométrie spectrale permettant de suivre l'activation plaquettaire, les caractéristiques des mégacaryocytes ainsi que leur différenciation à partir des cellules souches hématopoïétiques au cours de modèles murins inflammatoires ou infectieux.

De plus, les possibilités de tri cellulaire offertes par cette technique permettent l'isolation de populations ou sous populations particulières.

Nous présenterons donc les possibilités, les avantages et les limites de la cytométrie en flux appliquée à l'étude des plaquettes et des mégacaryocytes.

Cytométrie clinique appliquée aux pathologies plaquettaires

Évaluation de différents paramètres d'activation des plaquettes et neutrophiles en cytométrie en flux classique et spectrale

M. Portier (mailys.portier@efs.sante.fr), A. Prier, M.-A. Eyraud, C.-A. Arthaud, M. Heesterman, H. Hamzeh-Cognasse, F. Cognasse, [A.-C. Duchez](#)

U1059-Plaquettes & Inflammation, U1059 Inserm- Etablissement Français du Sang, Saint-Priest en Jarez, France

Introduction et Objectifs :

Les plaquettes sont de petites cellules anuclées dont la fonction primaire est le maintien de l'intégrité vasculaire. Toutefois, ce sont aussi des cellules immunitaires participant activement aux processus inflammatoires et la réponse anti-infectieuse. Notre objectif est d'évaluer leur activation dans un processus inflammatoire tel que le vieillissement.

Matériels et Méthodes :

Notre approche s'inscrit dans deux contextes : *in vitro/ex vivo* et *in vivo* : La numération sanguine de donneur humain en santé et de souris, de différents âges et sexes, est réalisée (MS4). Puis les plaquettes et les neutrophiles de ces donneurs, sont immuno-marqués selon différents panels d'anticorps pour mesurer en cytométrie en flux : leur activation (CD62P, PAC1, CD11b, Annexine V) et leur sénescence (Beta-galactosidase, HP-1, SIRT1). Nous avons comparé l'utilisation de deux cytomètre : FACS Canto II (BD Biosciences) *versus* spectral Northern Light (Cytek Biosciences) pour les analyses de cellules.

La taille des vésicules extracellulaires est évaluée par un Dynamic Light Scatter (Malvern) directement dans le plasma. Ces dernières sont ensuite immuno-marquées pour être quantifiées et identifier la source des vésicules extracellulaires par cytométrie en flux ultrasensible, spectral Northern Light.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Des différences significatives en numération sanguine apparaissent, ainsi que pour les marqueurs d'activation et de vieillissement plaquettaire et neutrophile, en fonction de l'âge. Les concentrations de vésicules extracellulaires sont aussi modulées. De plus, les résultats obtenus en cytométrie de flux (FACS Canto II *versus* Northern Light) sont comparables à la fois dans les modèles humains et murins pour les différents marqueurs cités précédemment.

Heterogeneity and spatial organisation of Tumour-Associated Mononuclear Phagocytes

C.-A. Dutertre¹ (cadutertre@gmail.com), K. Mulder², F. Ginhoux²

¹ Inserm U1015, Institut Gustave Roussy, Malkoff, France

² Inserm U1015, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

The composition and spatial organisation of the tumour microenvironment is now gaining attention especially immune cells, with the emergence of immunotherapies. Mononuclear phagocytes (MNP), the major immune cells populating tumours, comprise heterogenous subsets of monocytes (Mo), macrophages (Mac) and dendritic cells (DC). They are key regulators of the anti-tumour immunity. Mo and Mac (MoMac) most often promote tumorigenesis and metastasis. DC, can control the pool of tumour infiltrating T cells and, thus, regulate the T cell anti-tumour cytotoxicity.

In a recent study (Mulder, Immunity 2021), MoMac from 41 scRNAseq datasets were integrated to generate the universal "map" of human MoMac revealing three Mac subsets that accumulated in all solid tumours studied: (i) *TREM2* Mac, strongly biased towards a pro-tumour lipid metabolism; (ii) proliferating Mac; (iii) previously undescribed *IL4I1* Mac that express interferon stimulated genes, molecules involved in T cells regulation (PD-L1, PD-L2, MHC-II, CD40 and CD86), and that activate the aryl hydrocarbon receptor. Our analyses predicted that *IL4I1* Mac arise from monocytes through engagement of CD40L expressed by CD4+ T cells and their stimulation by IFN γ expressed by CD8+ T cells. *IL4I1* Mac could attract regulatory T cells (Treg) by secreting CXCL9/10/11, suppress anti-tumour T cell functionality via PD-L1/L2 and via the IDO1/IL4I1-mediated AHR pathway activation.

We also integrated 38,293 DC from 13 tissues to generate the DC-VERSE (Mulder, in revision). All neoplastic tissues studied contained CD207+ DC2 where their expansion correlated: (i) inversely with CD8+ T cells and T cell clonality; (ii) inversely with tumour CD8+resident memory T cells (TRM); (iii) positively with terminally differentiated effector memory "exhausted" CD8+ T cells (TEMRA); (iv) was associated with lower overall survival in ICB-treated patients. Next, we evaluated the localisation and interactions of MNP populations, defined in our recent studies, within the different niches of carcinomas, focusing on breast and lung tumours. Indeed, the spatial distribution of immune cell populations within the different tumour niches is a major factor impacting the quality of the anti-tumour immune response, especially of cytotoxic effector CD8+T cells. We employed immunofluorescence histology and MERFISH, a single cell spatial transcriptomic technology. While most DC populations accumulated within the tumour stroma together with lymphocytes, CD207+ DC2 were embedded within carcinomatous tumour nests. We confirmed that *TREM2* Mac and *FOLR2* Mac were detected within very distinct niches, the former detected within immune poor regions and *FOLR2*Mac within immune riche stromal regions. *IL4I1* Mac were detected both in the tumour stroma and tumour nests and were also forming some grape-like structures where they were in contact of T cells, especially Treg.

While scRNAseq allows to grasp the deep transcriptomic programmes of cells within the tumour microenvironment, data obtained using single cell spatial transcriptomic allow to evaluate their localisation and the cells they potentially interact with. Such information could lead to the discovery of prognostic markers and the development of therapeutic approaches to (i) deplete or inhibit the differentiation of pathogenic myeloid cell populations; (ii) disrupt their pathogenic interactions with stromal and immune cell populations.

Spatial biology: How to choose the best approach?

A. Meghraoui (meghraoui@amkbiotech.fr)

AMKbiotech, Biot, France

Unravelling tissue contexture is emerging as a key step to understand mechanisms of tissue homeostasis and its imbalance in order to develop adapted preventive and more effective treatments. Addressing the tissue as a heterogeneous complex system allows the analysis of its component phenotypes, functions and interactions in a comprehensive way and obtain a complete snapshot of the tissue at each investigated state.

Spatial biology is a rapidly evolving field. Numerous technologies and methodologies have been emerging these last years, propelling several scientific and clinical areas to a novel level of investigation.

Behind the endless advantages that these approaches bring, each of them comes with its own specifications, limits and bias that need to be taken into account to choose the best fitting approach. This will insure the best interpretation of the obtained results and the full exploration of the different opened paths.

Targets specificity, tissue type and preparation, analysis resolution and depth, full cost of the approach from tissue to results and real need of the approach, are key elements to address when choosing the best solution that would fit the project aim.

Mapping of T cell subpopulations within the whole tissue organization by non-cyclic multiplex immunofluorescence imaging

L. Guyonnet¹ (lea.guyonnet@curie.fr), S. Mestari^{1,2}, V. Premel², R. Leclere³, C. Guerin¹, M. Salou²

¹ Plateforme de cytométrie, Institut Curie, Paris, France

² INSERM U932, Institut Curie, Paris, France

³ Plateforme de Pathologie Expérimentale, Institut Curie, Paris, France

T cell lineages are defined by specialized functions and differential expression of surface antigens, cytokines, and transcription factors. Conventional T cells (CTC such as TCD4, TCD8, Thelper) are the best studied of the T cell subsets, but “unconventional” T cells (UTC such as iNKT, MAIT, $\gamma\delta$ T) have emerged as important players of tissue immunity during steady state and infection.

Currently, CTC and UTC are mostly identified by flow cytometry in cell suspensions following mechanical and/or enzymatic disruption of tissues, therefore losing spatial and structural information. Lately, questions regarding their global repartition in tissues, including lymphoid organs (such as lymph nodes, spleen) and other compartments (i.e., lung, liver, skin, gut, tumor among other) arose: where are located CTC and UTC in different tissues? Are they in different microenvironments? Are we able to point out specific interaction between these cells and other cells? What is the cellular organization in a specific tissue?

To tackle these questions, we developed *in situ* staining using spectral tissue cytometry (Orion technology). The recent advance of multiplex *in situ* imaging enables us to generate high resolution fluorescent multiplex images by increasing number of markers (up to 20) simultaneously assessed. In this study, we wanted to identify, localize, and quantify T cell subpopulations within whole sample sections from different mouse tissues at a single cell resolution. We built a panel to identify T cell lineages including CTC, UTC, and other immune cells (B cells, macrophages, myeloid cells), together with tissue structures (endothelium, epithelium, blood and lymphatic vessels) to localize T cell subpopulations and assess their respective proliferative state. We developed this panel for FFPE samples, but also tested it on frozen samples to fit with organ preparation requirements.

Several immune cell populations, including CTC and UTC were successfully identified *in situ* within mesenteric lymph nodes. Global cellular organization fit with expected structural characteristics allowing to map the cellular landscape and to move forward to other compartments. In this study, we are relying on our current knowledge from flow cytometry to target cells in the tissue and decipher the cellular organization at the organ level.

Étude des effets bénéfiques de l'administration intranasale de probiotiques dans un modèle murin de pneumonie

P. Hemon¹ (patrice.hemon@univ-brest.fr), P. Pochard¹, A. Uguen², S. Beuzit³, R. Le Berre³

¹ U1227, PF HYPERION, Brest, France

² U1227, CHRU, Brest, France

³ U1078, CHRU, Brest, France

La colonisation pulmonaire chronique à *Pseudomonas aeruginosa* (PA) des patients atteints de mucoviscidose est associée à un déclin de la fonction respiratoire. Cette bactérie est résistante à de nombreux antibiotiques conduisant parfois à des impasses thérapeutiques. La recherche d'alternative aux antibiotiques est donc essentielle.

Notre stratégie innovante est basée sur l'utilisation de bactéries bénéfiques, les *Lactobacillus*. Nous avons identifié des souches de *Lactobacillus* (isolées d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose) et montré sur un modèle murin de pneumonie à PA que les souris prétraitées par nos *Lactobacillus* administrés par voie nasale avaient une survie plus importante à 7 jours (100% contre 11.7%) et une diminution significative de la charge bactérienne pulmonaire par rapport aux souris non traitées.

Notre objectif est de comprendre l'effet bénéfique de ces *Lactobacillus* en utilisant la cytométrie en flux conventionnelle et la mesure de cytokines dans le liquide broncho-alvéolaire ainsi que l'analyse par cytométrie de masse Hyperion sur coupes de parenchyme pulmonaire murin.

Nous avons réalisé cette étude sur 6 groupes de 5 souris afin d'explorer les marqueurs de l'immunité innée et adaptative, marqueurs de la barrière épithéliale et endothéliale à la fois sur le LBA et le tissu.

Detection of tumor-derived extracellular vesicles interactions with immune cells by imaging cytometry is dependent on EV-labeling methods

A. Chipont¹ (anna.chipont@curie.fr), L. Loconte², R. El², D. Arguedas², A. Zhou³, L. Guyonnet¹, C. Guérin¹, E. Piovesana², J. L. Vázquez-Ibar⁴, A. Joliot², C. Théry³, L. Martín-Jaular³

¹ Plateforme de cytométrie, Institut Curie, Paris, France

² Inserm U932, Immunity and Cancer, Institut Curie, Paris, France

³ Inserm U932, Immunity and Cancer/CurieCoretech Extracellular Vesicles, Institut Curie, Paris, France

⁴ Institute for Integrative Biology of the Cell, Gif-sur-Yvette, France

Extracellular vesicles (EVs) are important mediators of cell-cell communication in a tumor microenvironment. Tumor-derived extracellular vesicles (TD-EVs) are able to interact with immune cells for functional modulation which impacts on the immune response to tumor. Faced with the difficulty of analyzing such small biological elements and their cellular incorporation, the implementation of techniques for analyzing EVs is essential.

Imaging flow cytometry is a method of choice to analyze EVs uptake as it provides information related to fluorescence intensity and location of each target at the single cell resolution. The ability to precisely localize the fluorescence within the cell with high resolution enable the design of customized masks and features to define conditional targets. To assess the impact of EV labelling methods on their cellular uptake, fate of TD-EVs labelled either with lipophilic dye MemGlow-488 (MG-488), with Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE), or through expression of a MyrPalm-superFolderGFP (mp-sfGFP) was analyzed by imaging flow cytometry after co-incubation with human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).

The establishment of a precise identification strategy based on the parameters of expression (intensity), morphology (cells area and side scatter), localization (extracellular, membranous, intracellular) and signal texture (homogeneity) allowed the assessment of EVs uptake by different cell types. Focusing on EVs positive cells, it was therefore possible to evaluate differences of EVs incorporation and signal according to their labeling/expression.

With this robust analytical method, TD-EVs appear to be taken up by different cell types and signal incorporation shows differences in texture and localization depending on labeling of EVs. This result demonstrates the importance of the choice of the labeling method for EVs identification and tracking, and underlines the necessity of implementing robust analysis to study EV-cell interactions.

La segmentation automatique de cellules sur des coupes histologiques de muscle squelettique marquées à l'Hématoxyline & Eosine met en évidence l'efficacité du transfert de gène dans la Gamma-Sarcoglycanopathie

J. Cosette¹ (jcosette@genethon.fr), M. Reinbigler², Z. Guesmia³, S. Jimenez¹, C. Fetita², E. Brunet⁴, D. Stockholm^{1,5}

¹ Plateforme Imagerie Cytométrie, Généthon, Evry, France

² Telecom Sud Paris, Institut polytechnique de paris, Evry, France

³ UMR-S 974, Centre de Recherche en Myologie, Paris, France

⁴ Tele, Ins, Evry, France

⁵ Ecole Pratique des Hautes Études, PSL Research University, Paris, France

La segmentation des cellules est le point de départ d'un grand nombre d'analyses d'images, et tout particulièrement dans la myologie. En effet, les fibres musculaires étant très longues, elles sont peu compatibles avec la cytométrie en flux ; en revanche, elles sont compatibles avec la cytométrie en images sur coupe histologiques. Il existe très peu de méthodes disponibles pour la segmentation de cellules musculaires à partir de coupes histologiques marquées en Hématoxyline et Eosine. Dans cette étude nous avons combiné un algorithme de Deep Learning : Cellpose, ainsi que le logiciel QuPath afin de créer un pipeline permet l'analyse complète des fibres musculaires. Nous avons choisi de mesurer le diamètre minimal des fibres musculaires, ainsi que les évènements de centronucléation. Ces deux paramètres sont connus pour être des indicateurs pertinents de santé d'un muscle. La précision de l'algorithme a été mesurée à travers le F1-score et l'efficacité de la segmentation a été démontrée dans une étude de transfert de gène dans la Gamma-Sarcoglycanopathie.

High-Plex Co-Detection of RNA and Protein to Explore Tumor-Immune Interactions Utilizing RNAscope with Imaging Mass Cytometry

E. Gregori (emilie.gregori@standardbiotools.com)

Standard BioTools France SARL, Paris, France

The next breakthroughs in immuno-oncology will be driven by high-plex tools that decipher the spatial arrangement of different cell types within the tumor microenvironment (TME). Imaging Mass Cytometry™ (IMC™) is a proven tool for the study of complex cellular interactions in the TME. It utilizes CyTOF® technology for simultaneous assessment of 40-plus protein markers at subcellular resolution without spectral overlap or background autofluorescence, thus providing unprecedented insight into the organization and function of the TME. Despite this, some protein targets are challenging to include in IMC as they have very few or no commercial antibodies available. Moreover, although cellular identity can easily be deciphered through detection of protein targets, knowledge of the cell's transcriptome improves understanding of cellular function and activation state. Here, we present a robust and reliable workflow that combines the highly sensitive and specific RNAscope™ technology for RNA detection with the multiplexing capability of IMC to visualize key RNA and protein markers in the same tumor samples. The RNAscope HiPlex v2 assay was combined with protein detection using IMC to evaluate expression of both RNA and protein targets in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue microarray (TMA).

Références :

1. Wang, F. et al. "RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." *The Journal of Molecular Diagnostics* 14 (2012): 22–29.
2. Hoch, T. et al. "Multiplexed Imaging Mass Cytometry of the chemokine milieu in melanoma characterizes features of the response to immunotherapy." *Science Immunology* 7 (2022): eabk1692
3. Schulz, D. et al. "Simultaneous multiplexed imaging of mRNA and proteins with subcellular resolution in breast cancer tissue samples by mass cytometry." *Cell Systems* 6 (2018): 25–36.

High-plex spatial imaging to decipher skin microenvironment complexity

A. Meghraoui (meghraoui@amkbiotech.fr), B. Buttard, M. Tiberti, M. Pentassuglia

AMKbiotech, Sophia-Antipolis, France

Objective:

Unravelling tissue contexture is emerging as a key step to understand mechanisms of tissue homeostasis and its imbalance in order to develop adapted preventive and more effective products. Addressing the skin as a heterogeneous complex system allows the analysis of its cellular and acellular component phenotypes, functions and interactions and obtain a complete snapshot of the skin at each investigated state.

Methods:

Imaging Mass Cytometry (IMC) is a High-Plex single-cell spatial imaging system which allows the simultaneous visualization and quantitative analysis of 40 markers and 200 targets in one skin section after a unique staining step and image acquisition. Combined to a tailored computational image analysis based on machine learning algorithms, this approach allows a quantitative evaluation of skin components' variations and treatments' effects.

Results:

The main challenge for the application of IMC is constructing the best antibody clone combination suitable for formalin-fixed and paraffin embedded (FFPE) or frozen tissue. Therefore, we developed a process to efficiently test cross-reactivity of anti-human FFPE and frozen antibodies in human tissues to incorporate the efficient ones in an IMC panel suitable for skin sections. We developed an innovative IMC panel allowing the analysis of key structural skin components, main dermis and epidermis resident cells and infiltrating immune cells, at once. This panel allows the characterisation of human skin sections. The computational analysis of the obtained high-plex images gives access to skin inflammation mechanisms, skin structure integrity and breakdown and skin regeneration from one image.

Conclusion:

Such a comprehensive and integrative analysis drives to a global scheme that depict skin balance breakdown and allows deeper investigation of products' effects.

Identification et évaluation d'anticorps monoclonaux anti-protéines de surface de *Clostridioides difficile*

D. Scalbert-Sterlin¹ (delphine.sterlin@aphp.fr), L. Hunault², E. Auria³, P. Englan³, J. Deschamps⁴, R. Briandet⁴, B. Dupuy³, P. Bruhns³, G. Gorochov⁵

¹ Département d'Immunologie, Sorbonne Université-APHP, Paris, France

² Sorbonne Université - Institut Pasteur, Paris, France

³ Institut Pasteur, Paris, France

⁴ Université Paris-Saclay, INRAE, Jouy-en-Josas, France

⁵ Sorbonne Université-APHP, Paris, France

Bacille anaérobie Gram positif, *Clostridioides difficile* est la première cause de diarrhées post antibiothérapie en milieu hospitalier. Depuis le début des années 2000, l'augmentation constante de son incidence et l'émergence de souches hypervirulentes telles que le ribotype 027 font de l'infection à *C. difficile* (ICD) un problème majeur de santé publique. Cependant, la plupart des études se concentre sur une souche de référence (la souche 630) ne circulant plus, en partie par manque d'outils permettant la détection des autres souches d'intérêt clinique de *C. difficile*.

Par ailleurs, la protéine de surface SlpA (Surface-layer protein A), protéine majoritaire de la membrane de *C. difficile* est connue pour jouer un rôle crucial dans les premières étapes de l'ICD. Des anticorps anti-SlpA ont été associés à une meilleure évolution de l'infection, sans détail sur les potentiels mécanismes protecteurs. De même, le rôle de SlpA dans la physiologie de *C. difficile* reste largement méconnu.

Dans ce travail, nous avons construit la première collection d'anticorps monoclonaux (Acm) anti-protéine de surface de *C. difficile*, ciblant la souche de référence mais aussi les souches cliniques les plus courantes en cytométrie en flux. Une caractérisation détaillée de cette collection nous a permis de dévoiler le rôle de la SlpA dans la croissance bactérienne, la sécrétion de toxines et la formation de biofilm. De façon intéressante, seul un Acm diminue la croissance bactérienne. De plus, les Acm présentent des effets opposés sur la sécrétion de toxines. Cette collection d'Acm a également été mise à profit pour le développement d'un test diagnostique en cytométrie en flux, permettant l'identification rapide de la souche de *C. difficile* à partir des selles de patients atteints d'ICD.

Ces résultats suggèrent que la réponse anti-protéine de surface de *C. difficile* inclut tout à la fois une facette protectrice et une facette délétère pour l'hôte. Cette collection d'Acm représente des outils précieux pour la recherche fondamentale et clinique.

La cytométrie en flux au service de la recherche dans le domaine des procédés microbiologiques alimentaires : exploration physiologique de bactéries pathogènes exposées à des perturbations technologiques et présentent sur des matrices sèches

S. Guyot (stephane.guyot@agrosupdijon.fr), S. Dupont, L. Beney

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Institut Agro Dijon, Dijon, France

Contexte :

Dans le domaine agroalimentaire, les procédés dits microbiologiques sont utilisés pour maîtriser des populations microbiennes d'intérêt ou non désirées. Dans ce contexte, l'optimisation ou le développement de nouveaux procédés vise soit à produire/stabiliser des microorganismes d'intérêt ou au contraire à détruire/limiter le développement de microorganismes non désirés. Les travaux de recherche menés dans le domaine du génie des procédés microbiologiques visent à mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la résistance et la mort microbienne pour *in fine* développer/optimiser des procédés.

Différentes techniques sont mises en œuvre pour étudier la réponse au stress des microorganismes : techniques dites de microbiologie classique, techniques moléculaires, spectroscopie, microscopie, cytométrie en flux etc... L'étude via la cytométrie de la réponse au stress de microorganismes présents ou non dans une matrice alimentaire présente des avantages mais aussi des inconvénients qu'il convient de prendre en compte pour *in fine* développer de nouveaux procédés basés sur l'étude de la physiologie microbienne couplée à l'étude des propriétés physico-chimiques de la matrice alimentaire et au dimensionnement des process.

Principaux Résultats et Discussion :

La cytométrie en flux est également un outil pertinent pour étudier l'impact de procédés de décontamination sur la physiologie de pathogènes des aliments. Nos travaux se sont en partie concentrés sur l'étude de l'impact de cycles de déshydratation et de réhydratation sur différentes bactéries pathogènes. Dans notre cas, la principale limite liée à l'utilisation d'un cytomètre réside dans le fait que les cellules doivent être suspendues dans une matrice liquide avant d'être analysées. Dans le cas de bactéries séchées (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Cronobacter sakazakii*) nous avons montré que l'étape de réhydratation et plus particulièrement la vitesse de réhydratation influence leur survie¹. Ainsi, il convient d'adapter cette étape de manière à limiter son impact avant passage en cytométrie : a) maîtrise de la vitesse de réhydratation et b) suspension et lavage des cellules dans un tampon (PBS par exemple) afin d'éliminer la matière organique composant la matrice alimentaire (lait en poudre : l'autofluorescence des protéines du lait pouvant interférer avec le signal fluorescent des sondes). Une fois l'étape de réhydratation maîtrisée il est possible de d'étudier l'impact de perturbations technologiques sur la physiologie bactérienne. Nous avons pu montrer que la mort de *Salmonella* Seftenberg et de *Cronobacter sakazakii* inoculés dans du lait en poudre était majoritairement liée à une altération des capacités respiratoires après un séchage à 25% d'humidité relative de l'air alors qu'elle était corrélée à une augmentation de la perméabilité membranaire après un traitement thermique secondaire à 90°C-100°C/30s-120s². Nous avons également pu étudier l'impact de différentes conditions de séchage en tampon PBS sur la perméabilité membranaire de *Listeria monocytogenes*³. L'utilisation de la cytométrie s'est avérée être un outil adapté à l'étude de la physiologie de microorganismes soumis à un procédé de séchage.

Il convient toutefois de remarquer que l'utilisation de sondes fluorescentes endogènes (GFP) peuvent modifier la résistance au stress⁴. Par ailleurs, il est possible d'utiliser la cytométrie en flux pour étudier des phénomènes transitoires tels que les mécanismes de perméabilisation transitoire de la membrane plasmique⁵.

Références :

1. Zoz et al., 2016. PLoS One, 11(2): e0148418.
2. Lang et al., 2018. Frontiers in Microbiology, 9: 475.
3. Zoz et al., 2021. Foods, 10(9): 2002.
4. Ragon et al., 2023. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 112603.
5. Guyot et al., 2015. Environmental Microbiology, 17(8): 2982-2992.

Évaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux : Perte de cultivabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur milieu gélosé suite à l'exposition à une émulsion huile dans eau

A. Dutoit (agathe.dutoit@univ-brest.fr), C. Trunet, N. Cossec, N. Decourcelle, A.-G. Mathot, L. Coroller

LUBEM, Université Bretagne Occidentale, Quimper, France

Introduction et Objectif :

La présence de bactéries sporulées dans les aliments transformés représente un danger pour les consommateurs car elles peuvent être à l'origine d'intoxications et d'altérations. La structure et les caractéristiques physico-chimiques d'un aliment peuvent influencer la physiologie des bactéries sporulées. Afin d'étudier et quantifier l'émergence des cellules végétatives, leur croissance ou leur inactivation dans un environnement complexe, ici une émulsion modèle huile-eau (H/E), une méthode de suivi de viabilité cellulaire a été mise en place par cytométrie en flux.

Matériels et Méthodes :

Des spores de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ont été inoculées à 10^5 UFC/ml en émulsion modèle H/E, ajustées à pH 6,0 et incubées à 30°C. L'émulsion modèle consiste au mélange par sonication de bouillon nutritif et de Tween 80 (phase aqueuse) avec de l'hexadécane et du Span 80 (phase grasse) à un ratio H/E de 50/50. La viabilité des cellules au sein de l'émulsion a été étudiée et quantifiée par cytométrie en flux au cours du temps grâce à un marquage au Syto 9/IP. Trois milieux gélosés ont été utilisés pour étudier la capacité des cellules à se revivifier : BHI agar (BHA), BHI agar supplémenté par de la catalase ou par un antioxydant, le thiourea.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Les analyses cytométriques ont montré une distinction claire entre les différentes populations de cellules : viables, endommagées et mortes directement au sein de l'émulsion. L'émergence d'une population de cellules végétatives apparaît à partir de 5h d'incubation et augmente à vitesse constante pour atteindre une concentration maximale de 7,5 log entre 10h et 24h. Les résultats montrent un taux constant de cellules viables (90% des cellules totales) entre 6h et 8h d'incubation. Au-delà de 9h, la proportion de cellules endommagées augmente et atteint 56% des cellules totales à 24h. Le recouvrement des cellules sur milieu BHA montre une chute de viabilité entre 7h et 9h d'incubation. Ces observations mettent en évidence l'apparition d'un état viable mais non cultivable de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans l'émulsion H/E, par méthode culturale. La supplémentation en catalase ou en thiourea du milieu BHA restaure totalement la capacité de revivification perdue par *B. weihenstephanensis* KBAB4 suite à son exposition et sa croissance au sein de l'émulsion H/E. Ces additifs permettent de réduire l'effet des espèces réactives de l'oxygène (ROS) présentes dans le milieu gélosé qui entraînent l'inhibition de la multiplication bactérienne (Kong et al., 2004; O'Donoghue et al., 2016). La détection de bactéries pathogènes au sein de matrices complexes est grandement influencée par la formulation de l'aliment ainsi que le choix des méthodes de dénombrement.

Références :

1. Kong et al., 2004. Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiology Ecology, 50(3), 133–142.
2. O'Donoghue et al., 2016. Blue-light inhibition of *Listeria monocytogenes* growth is mediated by reactive oxygen species and is influenced by σB and the blue-light sensor Lmo0799. Applied and Environmental Microbiology, 82(13), 4017–4027.

***Listeria monocytogenes* en industrie agroalimentaire : l'impact des conditions environnementales sur son état physiologique et ses capacités de croissance**

E. Hoch (e.hoch@aerial-crt.com), A. Lintz, B. Hezard, V. Stahl, L. Omhover-fougry

AERIAL, Illkirch Graffenstaden, France

En industrie agroalimentaire, les contaminations accidentelles de *Listeria monocytogenes* peuvent survenir malgré les processus de désinfection des surfaces, ou l'effet inhibiteur d'additifs/d'ingrédients dans les aliments, mis en place afin de garantir le respect de l'hygiène et des critères microbiologiques. Ces mesures de maîtrise représentent un stress pour le pathogène, dont l'état physiologique et le développement vont fluctuer selon les conditions rencontrées. Les objectifs de cette étude sont de (1) décrire les réponses physiologiques de *Listeria monocytogenes* face à différents stress et de (2) caractériser l'impact de ces stress sur la capacité de reprise de croissance du pathogène en conditions optimales.

Deux souches de *Listeria monocytogenes* LM14 et LM352 sont exposées à des facteurs environnementaux de façon indépendante : du chlorure de benzalkonium à une concentration cible de 20 mg/L pendant 30 min ou une solution de NaCl saturée pendant 25h à 25°C. Après application du stress, les souches sont remises en culture à 25°C, en bouillon tryptone soja supplémenté avec de l'extrait de levure. La viabilité et l'intégrité membranaire des souches, après stress et pendant la croissance, sont évaluées par cytométrie en flux (Sysmex®), grâce à un double marquage à la carboxyfluorescéine diacétate (cFDA) et à l'Iodure de Propidium (IP). La cultivabilité des souches est également mesurée par numération sur milieu gélosé cœur-cervelette.

Une perte variable de la population, allant de 1,5 à 8 log₁₀ UFC/mL, est constatée à la suite de l'action du désinfectant à la concentration et à la durée appliquée. Ce résultat est corrélé avec un marquage des cellules par l'IP, en cytométrie en flux, traduisant la perméabilité membranaire sans activité enzymatique des cellules stressées. Quelques cellules vivantes subsistent à la suite de l'action du désinfectant, dotées d'une capacité de reprise de croissance. En revanche, le stress salin entraîne un taux de perte beaucoup plus faible, de 0,5 log₁₀ UFC/mL par rapport à la condition non-stressée. Les cellules exposées à une solution saturée en NaCl pendant 25h sont marquées par la cFDA, démontrant l'existence d'une activité enzymatique résiduelle, mais également par l'IP traduisant une altération de la membrane. De plus, une corrélation entre la reprise de croissance et la proportion de cellules vivantes est établie à la suite du stress NaCl. La capacité de re-croissance révèle une adaptation des souches à ce stress, ainsi que l'existence de mécanisme(s) de réparation des membranes. Des études complémentaires de compréhension de ces mécanismes d'adaptation et de réparation, chez d'autres pathogènes notamment, seront nécessaires. Ces investigations permettront d'identifier des leviers pour contribuer à la maîtrise des contaminations de bactéries pathogènes dans les aliments.

Utilisation de la cytométrie en flux pour l'étude de mécanismes de résistance de *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme

J. Manaranche¹ (jeanne.manaranche@lcc-toulouse.fr), E. Näser², J.-M. Augereau¹, K. Reybier³, F. Benoit-Vical¹

¹ Laboratoire de Chimie de Coordination - UPR 8241, CNRS, Toulouse, France

² Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale - UMR 5089, CNRS, Toulouse, France

³ PHARMADEV - UMR 152, IRD, Toulouse, France

En 2021, 247 millions de cas de paludisme responsables de 619 000 décès ont été signalés, dont environ 90 % sont attribués au parasite *Plasmodium falciparum* (1). L'artémisinine et ses dérivés, aussi appelés artémisinines, constituent le traitement de première intention contre le paludisme. Ces molécules inhibent la polymérisation de l'hème, issu de la digestion de l'hémoglobine par le parasite, en cristaux d'hémozoïne, entraînant la formation de composés toxiques pour le parasite (2). Malheureusement, la résistance aux artémisinines est présente dans plusieurs zones endémiques (3). Sous traitement aux artémisinines, une partie de la population parasitaire entre en quiescence, que les parasites proviennent d'une souche sensible ou d'une souche résistante (4). Pendant cet arrêt du cycle parasitaire, certaines voies métaboliques sont arrêtées, ce qui rend les parasites quiescents difficiles à éliminer (5). Cependant, la mitochondrie du parasite reste active (5).

Le but de ce travail est de comparer les capacités d'entrée et de sortie de quiescence de souches de *P. falciparum* résistantes ou sensibles aux artémisinines. Pour cela, les parasites entrés en quiescence sous traitement aux artémisinines sont identifiés, triés puis remis en culture. Ceci doit permettre de préciser l'importance de la quiescence dans le mécanisme de la résistance aux artémisinines.

Deux souches résistantes aux artémisinines de *P. falciparum* et leurs jumelles sensibles ont été étudiées.

Les parasites sont traités ou non pendant 20h à la dihydroartémisinine (dérivé de l'artémisinine) pour induire la quiescence, puis marqués. Deux sondes moléculaires sont utilisées pour le marquage des parasites quiescents : le Sybr Green (se lie à l'ADN, et marque les parasites vivants et morts) et le MitoTracker Deep Red (s'accumule dans les mitochondries actives, et marque uniquement les parasites vivants). Les parasites quiescents sont ensuite triés à l'aide du cytomètre de flux BD FACSAria™ Fusion, puis remis en culture. Un suivi de la cinétique de la parasitémie est ensuite réalisé par frottis sanguins.

Les premières données montrent un nombre de parasites quiescents plus élevé chez les souches résistantes aux artémisinines que chez les souches sensibles. En revanche, pour un même nombre de parasites quiescents triés, il ne semble pas y avoir de différence de reprise de la prolifération des parasites, qu'ils soient issus d'une souche sensible ou d'une souche résistante aux artémisinines.

La résistance de *P. falciparum* aux artémisinines pourrait donc être liée à une plus grande capacité des parasites résistants à entrer en quiescence. Ces résultats devraient permettre d'identifier de nouvelles cibles médicamenteuses en relation avec les voies métaboliques toujours actives durant la quiescence du parasite.

Références :

1. WHO, 2022, Malaria report.
2. Robert et al., 2005, PNAS, 102(38):13676-80.
3. Ward, Fidock et al., 2022, Curr Opin Microbiol., 69:102193.
4. Peatey et al., 2021, J Infect Dis, 223(9):1631-1638.
5. Witkowski et al., 2010, AAC, 54(5):1872-7.

Cibler le complexe polycomb PRC2 pour améliorer la réponse aux immunothérapies anti-CD38 dans le Myélome Multiple

J. Moreaux¹ (jerome.moreaux@igh.cnrs.fr), D. Chemlal², E. Varlet³, A. Machura², S. Ovejero¹, G. Requirand⁴, N. Robert⁴, G. Cartron⁴, E. Alaterre³, C. Bret¹, L. Vincent⁴, C. Herbaux¹, G. Cavalli³, A. Bruyer², H. De Bousac²

¹ Institut de Génétique Humaine / CHU Montpellier, Montpellier, France

² Diag2Tec, Montpellier, France

³ Institut de Génétique Humaine, Montpellier, France

⁴ CHU Montpellier, Montpellier, France

Multiple myeloma (MM) is the second most common hematological malignancy characterized by the accumulation of malignant plasma cells within the bone marrow. MM is characterized by high molecular and clinical heterogeneity. During the last 10 years, new therapeutic classes including targeted immunotherapies significantly improved the overall survival of MM patients, but drug resistance and relapse remain major challenges. Resistance to CD38 targeted immunotherapies has been associated with marked reduction of CD38 expression via different mechanisms.

Our group previously described a link and a negative correlation between CD38 and EZH2 expression during normal B to plasma cell differentiation in association with a transcriptional control of CD38 expression involving the polycomb PRC2 complex (Herviou et al. *Leukemia*. 2019). Here we identified a significant negative correlation between CD38 expression and EZH2 expression in 2 independent cohorts of MM patients. Interestingly, in a cohort of 97 patients at relapse treated with daratumumab, we also observed a significant higher EZH2 expression in the non-responder subgroup of patients. Among these 97 patients, gene expression profiling data of purified MM cells were available for 51 patients and we identified that high *EZH2* expression is associated with a significant shorter event free survival after treatment by anti-CD38 MoAb. Altogether, these data underlined a potential link between EZH2 and CD38 expression in MM. Thus, we hypothesized that PRC2 targeting using a specific EZH2 inhibitor could result in CD38 re-expression to overcome anti-CD38 MoAbs resistance in MM. We demonstrated that treatment of MM cells with EZH2 inhibitor leads to a significant upregulation of membrane CD38 expression in cell lines and primary MM cells from patients. Interestingly, CD38 re-expression was linked to an improvement of Daratumumab and Isatuximab ADCC efficiency. Remarkably, ChIP-seq analyses underlined a significant association of H3K27me3 mark at CD38 promoter in CD38neg and CD38low cell lines compared to CD38high cells. Overall EZH2 targeting may be of therapeutic interest to overcome resistance to anti-CD38 targeted immunotherapies in Multiple Myeloma. Epigenetic characterization of the H3K27me3/H3K4me3 bivalent status of CD38 promoter in MM cells may be of interest to guide this therapeutic approach.

Références :

1. Chemlal D et al. EZH2 targeting induces CD38 upregulation and response to anti-CD38 immunotherapies in multiple myeloma. *Leukemia*. 2023.

Analyses non supervisées pour le diagnostic et le suivi des gammopathies monoclonales

N. Freynet¹ (nicolas.freynet@aphp.fr), S. Wuillème², T. Matthes³

¹ Département d'Hématologie et Immunologie biologiques, APHP, GHU Henri Mondor, Créteil, France

² Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier de Nantes, Nantes, France

³ Service d'Hématologie, Hôpitaux universitaires de Genève, Genève, Suisse

Introduction et Objectifs :

La cytométrie en flux est un outil précieux dans le diagnostic mais également dans le suivi de la réponse au traitement (recherche de la maladie résiduelle ou MRD) des gammopathies monoclonales. L'analyse des données est traditionnellement effectuée de façon supervisée par le cytométriste, qui se base à la fois sur la présence ou l'absence d'expression de marqueurs de surface et/ou intracytoplasmiques par rapport à des plasmocytes normaux et sur la restriction isotypique du contingent pathologique. Les algorithmes de réduction dimensionnelle et de clustering pourraient permettre une analyse non supervisée des données brutes afin de détecter plus aisément et rapidement la présence d'un cluster de plasmocytes pathologiques.

Cette étude a pour objectif de tester la capacité de ces algorithmes à détecter de tels clusters, au diagnostic ou lors du suivi, et d'en établir les avantages et les limites par rapport à une analyse supervisée.

Matériel et Méthodes :

Des fichiers de cytométrie en flux de gammopathies monoclonales ont été sélectionnés dans plusieurs centres en fonction des résultats obtenus en cytométrie supervisée : au diagnostic avec ou sans plasmocytes pathologiques, en suivi de la MRD avec ou sans cluster résiduel de plasmocytes pathologiques.

Plusieurs algorithmes ont été utilisés pour analyser ces fichiers sur la plateforme Cytobank® (Beckman-Coulter): PeacoQC, tSNE-CUDA, flowSOM. Différentes configurations ont été testées afin de sélectionner les plus pertinentes. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus en cytométrie supervisée. Afin d'évaluer la robustesse de la stratégie d'analyse non supervisée, plusieurs fichiers ont été analysés indépendamment sur différents centres et les résultats ont été comparés.

Résultats, Discussion et Conclusion :

Les résultats obtenus lors de ces premiers essais mettent en évidence une bonne capacité de ces algorithmes à détecter des plasmocytes pathologiques au diagnostic, y compris sur des populations minoritaires. En suivi, des difficultés ont été rencontrées avec certains fichiers identifiés MRD+ en cytométrie supervisée du fait de la clusterisation des rares plasmocytes pathologiques avec d'autres populations. Des modifications dans le paramétrage de l'algorithme ont permis de limiter l'impact de ce biais de clusterisation. L'identification du phénotype plasmocytaire grâce aux *heatmap* produites par Cytobank® est satisfaisante bien que manquant de précision par rapport à une analyse supervisée. En première analyse cette stratégie semble assez robuste, avec une bonne corrélation des résultats obtenus sur différents centres pour les mêmes données brutes.

Ces premières données montrent l'intérêt de ces algorithmes mais certaines limites sont apparues, en particulier pour la recherche de MRD chez les patients traités par immunothérapie anti-CD38, rendant le clustering plus aléatoire. Des essais multicentriques à plus large échelle sont en cours pour affiner le paramétrage algorithmique et mettre au point une stratégie permettant d'obtenir la meilleure concordance possible avec l'analyse cytométrique supervisée.

Références :

1. Quintelier K, Couckuyt A, Emmaneel A, Aerts J, Saeys Y, Van Gassen S. Analyzing high-dimensional cytometry data using FlowSOM. Nat Protoc. 2021 Aug;16(8):3775-3801. doi: 10.1038/s41596-021-00550-0. Epub 2021 Jun 25. PMID: 34172973.

Study of T cells in patients with multiple myeloma treated with CD3xBCMA bispecific antibody

Y. Simoni (yannick.simoni@inserm.fr), N. Deredec, L. Aziez, I. Boussaid, J. Decroocq, R. Birsén, O. Kosmider, L. Willems, M. Fontenay, P. Franchi, N. Chapuis, D. Bouscary, M. Vignon

Institut Cochin, Paris, France

Recently, the development of engineered bi-specific antibodies opened a new era in immunotherapy. In the context of Multiple Myeloma (MM), bi-specific antibody treatment brings together T cells (CD3 antigen) and tumor cells (BCMA antigen), leading to tumor cells lysis by T cells. Recently, T cells receptor (TCR) analysis in MM patients treated with BCMAxCD3 bi-specific antibodies reveals a clonal expansion of T cells, suggesting an antitumoral T cells response induced by this treatment. Overall, these data clearly demonstrate that MM can be targeted by immunotherapy, but treatment efficiency needs to be improved. Therefore, identification and characterization of tumor antigens specific T cells, represent an important axis of research in MM to improve patients' response (e.g. Immune check point inhibitor antibodies, vaccination with tumor antigens...) in combination with the current treatment (i.e. CD3xBCMA bi-specific treatment).

Identification and characterization of anti-tumor T lymphocytes in patients at diagnosis and remission, to determine whether the identification of these populations could constitute a predictive marker for the response to this treatment.

We used mass-cytometry approach to characterize T cells populations.

Our data shows much greater complexity in the CD4 and CD8 T cell population than previously appreciated at early time point. Moreover, we observed a non-uniform pattern of variations across patients tested, which highlights a broad diversity of these cells as previously described. These observations, particularly with respect to markers associated with T cells exhaustion, may help to explain heterogeneity in clinical outcomes following various forms of immunotherapy.

26^e CONGRÈS ANNUEL DE L'ASSOCIATION FRANÇAISE DE CYTOMÉTRIE

15-17 novembre



CYTOMÉTRIE 2023



Centre de Congrès Pierre Baudis TOULOUSE

LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHÉES



P1 - Avancées Technologiques

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications affichées</i>			
BARRIENTOS	Lorena	A new method for the automated enumeration and analysis of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by flow cytometry	P1-1
BURGAUD	Mégane	The Camelid-derived VHH-antibody JK36 overcomes epitope masking by therapeutic Anti-CD38 Antibodies	P1-2
		Easy-to-use functional NK cells assay and associated stimulation reagent	P1-3
DUPAS	Nathalie	New ready-to-use and automation-friendly solution for basic phenotyping of human whole blood and derived PBMC suspension	P1-4
LASGI	Charlène	Establishment of a standardized multi-site Cytometry - single cell omics - NGS pipeline at the Institut Curie	P1-5
SAUSSET	Alix	Identification et séparation de deux populations de macro-parasites par cytométrie en flux	P1-6

P3 - Jeunes Cytométristes

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
AL SAMARA	Jules	Suivi en cytométrie en flux des patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 pour lymphome cérébral : Marqueurs et dynamiques de réponse et de toxicité	P3-1
BOUISSET	Clément	Défaut d'activation conformationnelle de l'intégrine LFA-1 dans les lymphocytes CAR-T thérapeutiques	P3-2
GARNIER	Hugo	Un grand nombre de paramètres implique de grandes responsabilités : comment passer du conventionnel au spectral avec succès en plateforme ?	P3-3
POPOFF	Dimitri	50 nuances de Fluo pour suivre la réponse immunitaire	P3-4
<i>Communications affichées</i>			
CAOUAILLE	Maxime	Détermination du rôle fonctionnel et de la localisation pulmonaire des sous-populations de cellules T CD8+ effectrices et mémoires conventionnelles pendant l'infection par Mycobacterium tuberculosis	P3-5
FRANÇOIS	David	Application de la loi d'Arrhénius pour la détermination d'une date limite d'utilisation de réactifs de cytométrie	P3-6
LECOLANT	Solène	Intérêt de l'exploration du profil d'expression du CD38 associé au score d'Ogata-R dans le diagnostic d'un syndrome myélodysplasique	P3-7
NOGUEROL	Julie	La répression génique dépendante de l'hétérochromatine contrôle la réponse des cellules T CD4 à l'immunosuppression médiée par les Treg	P3-8

SP1 - Cancérologie

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communication orale sélectionnée</i>			
SIMONI	Yannick	Deciphering tumor-specific T cells in Acute Myeloid Leukemia	SP1-1
<i>Communications affichées</i>			
MOUDOMBI	Lyvia	Immunosurveillance des lésions préneoplasiques : hétérogénéité du neutrophile au cours de la carcinogenèse colorectale humaine	SP1-2
PETIT	Patrice X.	Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress of lymphoblastoid cells: an intricate crosstalk between mitochondria, mitophagy and mitophagic cell death	SP1-3

SP2 - Hématologie clinique 1

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
DEBLIQUIS	Agathe	Analyse par cytométrie en flux du dépôt de C3d sur les hématies de patients HPN traités par inhibiteurs de la fraction C5 du complément	SP2-1
LE GARFF-TAVERNIER	Magali	Les rares cellules présentant un déficit en protéines GPI-liées peuvent être considérées comme un véritable clone HPN selon les données de l'Observatoire National des clones HPN	SP2-2
<i>Communications affichées</i>			
KASSI	Hermance Y. E.	Incidence des phénotypes aberrants dans les leucémies aiguës en Côte d'Ivoire : étude préliminaire	SP2-4
OUKID	Salima	Profil phénotypique et évolutifs des tailles des clones de l'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne dans les Aplasies Médullaires Acquisées	SP2-5
RAGGUENEAU	Victoria	Mystère à Philadelphie	SP2-6
SAKALIAN	Oliver	Leucémie aiguë promyélocytaire typique : les « roots » sont de retour. À propos de 2 cas récents	SP2-7
TOUMI	Nour El Houda	Apport de la cytométrie de flux dans le diagnostic des leucémies aiguës : À propos de 5 cas pédiatriques	SP2-8

SP3 - μvésicules/μparticules

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communication orale sélectionnée</i>			
CAZARETH	Julie	La cytométrie en flux pour étudier l'interaction entre périlipines et gouttelettes lipidiques	SP3-1

SP4 - Hématologie clinique 2

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
ARZUL	Vincent	Le CD25 : un marqueur de transformation des lymphomes T cutanés ?	SP4-1
GERBER	Léane	Étude comparative des dosages de l'IL-10 et IL-6 par Cytometric Bead Array (CBA) sur FACSCanto II et Navios Ex dans le cadre du diagnostic et du suivi des Lymphomes Oculo-Cérébraux (LOC)	SP4-2
<i>Communications affichées</i>			
ADDAKIRI	Sara	Diagnostic des Leucémies à grands lymphocytes granuleux par cytométrie en flux : Expérience du laboratoire d'hématologie CHU IBN ROCHD Casablanca	SP4-3
		Profil épidémiologique, cytologique et phénotypique des leucémies à tricholeucocytes : Expérience du laboratoire d'hématologie CHU IBN ROCHD Casablanca Maroc	SP4-4
ARZUL	Vincent	Un cas rare de leucémie à grands lymphocytes à grains CD4+	SP4-5
COINTE	Sylvie	Apport de l'analyse de vitré par cytométrie en flux pour le diagnostic de lymphomes oculo-cérébraux	SP4-6
		Lymphoprolifération NK/T chez un patient CA-EBV	SP4-7
DELLA TORRE	Lucas	L'importance du CD103 dans le phénotypage T : Un lymphome T associé à une entéropathie révélé par l'immunophénotypage des cellules tumorales circulantes	SP4-8
JMILI	Nejia	Les néoplasies lymphoïdes matures B CD5 négatives : Confrontation cytométrie en flux-cytologie	SP4-9

MEZRIGUI	Rihem	Étude des lymphocytes T CD4+/CD8+ au cours de l'infection par le VIH par cytométrie en flux : expérience monocentrique en Tunisie	SP4-10
		Étude de la stabilité des échantillons destinés à l'estimation des sous-populations lymphocytaires T par cytométrie en flux	SP4-11
OUKID	Salima	Profil immunophénotypique des Leucémies Lymphoïdes Chroniques par cytométrie en flux	SP4-12
TOUMI	Nour El Houda	Expression des marqueurs aberrants au cours des leucémies aiguës en pédiatrie analysées par cytométrie de flux	SP4-13

SP6 - Métabolisme

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
MICHAUD	Henri-Alexandre	Investigating the metabolic profile of immune and non-immune cells in solid tumor by imaging mass cytometry	SP6-1
SIMONI	Yannick	Single-Cell Metabolic Analysis in Leukemia by Mass-cytometry	SP6-2
<i>Communication affichée</i>			
POTON	Perrine	Effets d'une supplémentation en extrait de plante sur le métabolisme mammaire de la vache laitière observés sur cellules isolées du lait par cytométrie en flux	SP6-3

SP8 - Microbiologie 1

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
JORIS	Pierre	Étude de la bactérie <i>Cupriavidus necator</i> pour une application spatiale en support vie : Utilisation de la cytométrie en flux pour caractériser la composition de la biomasse	SP8-1
PIJPSTRA	Pauline	Characterization of plasmid expression level heterogeneity, at single cell level, through heterologous eGFP expression in co-expression with recombinant isopropanol production in <i>Cupriavidus necator</i>	SP8-2
<i>Communication affichée</i>			
FIFANI	Barbara	Viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pendant la cuisson de la pâte à pain par cytométrie en flux	SP8-3

SP9 - Immunologie / Infectiologie

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
BARASCUD	Rébecca	Impact du stress prénatal maternel sur la programmation à long terme des Lymphocytes T CD4+	SP9-1
NOURIKYAN	Julien	Workflow d'analyse de données de cytométrie de flux totalement automatisé pour évaluer les effets de candidats adjuvants sur les compartiments de cellules B et T mémoires dans un essai clinique de phase I	SP9-2
KHAZEN	Roxana	Deciphering the Functional Heterogeneity of Cytotoxic T Lymphocytes	SP9-3
KWAN	Oswin	Utilisation de techniques de biologie des systèmes pour une analyse détaillée de la réponse immunitaire au vaccin à ARN messenger BNT162b2 chez les patients ayant bénéficié d'une allogreffe	SP9-4
<i>Communications affichées</i>			
AIT-BELKACEM	Ines	Flow cytometry based functional assay to study the bias of PBMC analysis compared to whole blood	SP9-5
COURTOIS	Justine	Xenogeneic graft-versus-host disease in humanized NSG and NSG-IL15 mice	SP9-6

FERRAYÉ	Léa	Lien de causalité entre l'expression bi-allélique de TLR7 et le développement d'auto-anticorps pathogéniques dans le lupus systémique érythémateux	SP9-7
MALERGUE	Fabrice	Innate immunity blood biomarkers can help for the triage of infectious and emerging diseases	SP9-8
MILLET WALLISKY	Ewa	One step process analysis avoids loss of monocytes in cerebrospinal fluid (CSF)	SP9-9
PEROCESCHI	Romain	Les cellules T CD4 régulatrices Eomes+ Foxp3+ infiltrent le système nerveux central pendant la neuro-inflammation et présentent des fonctions suppressives réduites et une plasticité accrue	SP9-10
RITACCO	Caroline	Contribution des neutrophiles à la pathogenèse de la sclérose latérale amyotrophique	SP9-11

SP10 - Immunologie clinique

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
ADDAKIRI	Sara	Modification de l'expression des Antigènes HLA-DR et CD64 des leucocytes humains par cytométrie en flux : marqueurs fiables de survenue du sepsis chez les patients en réanimation ?	SP10-1
CARTAGENA GARCÍA	Celia	Leveraging whole blood-based functional flow cytometry assays to stratify and monitor rheumatoid arthritis patients	SP10-2
RODRIGUEZ	Céline	Le Pexidartinib, un inhibiteur de CSF-1R, impacte la différenciation des cellules dendritiques en inhibant la signalisation de FLT3 chez les patients traités par anti-PDL-1 - résultats d'une étude de phase 1	SP10-3
<i>Communication affichée</i>			
BOURGOIN	Pénélope	Long term cellular immune response persistence among COVID-19 vaccinated rheumatoid arthritis patients treated by Rituximab	SP10-4

SP11 - Vieillesse

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communication orale sélectionnée</i>			
PRIME	Morgane	Caractérisation de la neuroinflammation et des modulations phénotypiques de la microglie au cours de la maladie de Parkinson par cytométrie en flux	SP11-1

SP12 - Forum Groupe 3C

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communication orale sélectionnée</i>			
HAUCHAMPS	Philippe	Identification d'effets de lot et contrôle visuel de qualité d'échantillons de cytométrie par CytoMDS, un nouvel outil de visualisation en basses dimensions des distances entre échantillons 'single cell'	SP12-1

SP13 - High Content Cytometry

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communication orale sélectionnée</i>			
SCHMUTZ	Sandrine	43 parameters for deep phenotyping of blood mononuclear cells, using specific features of spectral technology	SP13-1
<i>Communication affichée</i>			
GREGORI	Emilie	Simplifying High-Parameter Phenotypic and Functional Characterization of Cancer Immune Cells	SP13-2

SP14 - Microbiologie 2

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
FRANÇOIS	David	Détection et quantification de levures d'altération du vin (<i>Brettanomyces</i>) par une méthode couplant séparation immuno-magnétique et cytométrie	SP14-1
SCALBERT-STERLIN	Delphine	Analyse de la réponse immune systémique et mucoale anti-probiotiques	SP14-2

SP16 - High Content Imagerie

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
GUYONNET	Léa	Mapping of T cell subpopulations within the whole tissue organization by non-cyclic multiplex immunofluorescence imaging	SP16-1
HEMON	Patrice	Étude des effets bénéfiques de l'administration intranasale de probiotiques dans un modèle murin de pneumonie	SP16-2
<i>Communications affichées</i>			
CHIPONT	Anna	Detection of tumor-derived extracellular vesicles interactions with immune cells by imaging cytometry is dependent on EV-labeling methods	SP16-3
COSETTE	Jérémy	La segmentation automatique de cellules sur des coupes histologiques de muscle squelettique marquées à l'Hématoxyline & Eosine met en évidence l'efficacité du transfert de gène dans la Gamma-Sarcoglycanopathie	SP16-4
GREGORI	Emilie	High-Plex Co-Detection of RNA and Protein to Explore Tumor-Immune Interactions Utilizing RNAscope with Imaging Mass Cytometry	SP16-5
MEGHRAOUI	Aïda	High-plex spatial imaging to decipher skin microenvironment complexity	SP16-6

SP17 - Microbiologie 3

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communications orales sélectionnées</i>			
DUTOIT	Agath	Évaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux : Perte de cultivabilité de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 sur milieu gélosé suite à l'exposition à une émulsion huile dans eau	SP17-1
HOCH	Élodie	<i>Listeria monocytogenes</i> en industrie agroalimentaire : l'impact des conditions environnementales sur son état physiologique et ses capacités de croissance	SP17-2
MANARANCHE	Jeanne	Utilisation de la cytométrie en flux pour l'étude de mécanismes de résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> , agent du paludisme	SP17-3

SP18 - Hématologie clinique 5

Nom	Prénom	Titre de la communication affichée	N° poster
<i>Communication orale sélectionnée</i>			
SIMONI	Yannick	Study of T cells in patients with multiple myeloma treated with CD3xBCMA bispecific antibody	SP18-1

26^e CONGRÈS ANNUEL DE L'ASSOCIATION FRANÇAISE DE CYTOMÉTRIE

15-17 novembre



CYTOMÉTRIE 2023



Centre de Congrès Pierre Baudis TOULOUSE

LISTE DES PARTICIPANTS



[Retour sommaire](#)

ABOUZID Omar

EasyPanel
FRANCE
omar_zid@flow-cytometry.net

ADDAKIRI Sara

Faculté de Médecine et de Pharmacie
CASABLANCA – MAROC
saraaddakiri1995@gmail.com

ADLER Sophie

Microbiologie
Laboratoires Dubernet
MONTREDON-DES-CORBIÈRES – FRANCE
+33 4 68 90 92 00
sophie.adler@dubernet.com

AFONSO Georgia

EcellFrance Montpellier-IRMB UM
MONTPELLIER – FRANCE
+33 613714518
georgia.afonso@inserm.fr

AGUILAR Frédéric

Ozyme
SAINT-CYR-L'ÉCOLE – FRANCE
faguilar@ozyme.fr

AIMÉ Alexis

CytomeTRI
BIOSIT
RENNES – FRANCE
+33 6 58 93 73 62
alexis.aimé@univ-rennes.fr

AIT-BELKACEM Inès

Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
iaitbelkacem@beckman.com

AITYAYA Julien

Diag2tec
MONTPELLIER – FRANCE
+33 467557753
j.aityaya@diag2tec.com

AKNIN Marie-Laure

IPSIT
Inserm
ORSAY – FRANCE
+33 1 80 00 61 83
marie-laure.aknin@universite-paris-saclay.fr

AL SAMARA Jules

Département d'immunologie
AP-HP
PARIS – FRANCE
+33 6 63 87 73 40
jules.alsamara@aphp.fr

ALAMOME Isabelle

Laboratoire d'Hématologie
Hôpitaux Civils de Colmar
COLMAR – FRANCE
+33 3 89 12 42 32
isabelle.alamome@ch-colmar.fr

ALCARAZ Florence

R&D
ImCheck Therapeutics
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 13 96 14 90
florence.alcaraz@imcheck.fr

ALFARO Alexia

Imaging and Cytometry Platform
Institut Gustave Roussy
VILLEJUIF – FRANCE
+33 1 42 11 24 34
alexia.alfaro@gustaveroussy.fr

ALUNNI Benoit

IJPB UMR1318
INRAe
VERSAILLES – FRANCE
+33 6 21 52 64 07
benoit.alunni@inrae.fr

AMOYAL William

Vizgen
CAMBRIDGE – ÉTATS-UNIS
+33 6 52 45 43 59
william.amoyal@vizgen.com

ANDRIEU Muriel

CYBIO
Institut Cochin-Inserm U1016-CNRS
UMR8104
PARIS – FRANCE
+33 1 40 51 65 08
muriel.andrieu@inserm.fr

ANESI Nina

Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 44 55
nina.anesi@inserm.fr

ARNOUX Isabelle

Laboratoire Hématologie
CHU Timone
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 91 38 57 83
isabelle.arnoux@ap-hm.fr

ARZUL Vincent

Hopital Henri-Mondor APHP
PARIS – FRANCE
+33 6 46 74 46 07
vincent.arzul@aphp.fr

AYYOUB Maha

Centre de Recherches en Cancérologie
CRCT UMR1037 Inserm
Univ. Toulouse 3 / CNRS
TOULOUSE – FRANCE
+33 675987165
maha.ayyoub@inserm.fr

BAGCA Fatma

Thermo Fisher Scientific
ISSY-LES-MOULINEAUX – FRANCE
+33633699587
fatma.bagca@thermofisher.com

BARASCUD Rébecca

Infinity
TOULOUSE – FRANCE
rebecca.barascud@inserm.fr

BARDET Valérie

Hématologie-Immunologie-Transfusion
CHU Ambroise Paré
BOULOGNE-BILLANCOURT – FRANCE
+33 1 49 09 54 13
valerie.bardet@aphp.fr

BARRIENTOS Lorena

Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 91 17 27 00
lbarrientos@beckman.com

BATTISTON Priscillia

Plateforme de cytométrie
Centre Léon Bérard
LYON – FRANCE
+33 4 78 78 29 12
priscillia.battiston-montagne@lyon.unicancer.fr

BATTUT Louise

équipe 3
Inserm, IRSD
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 02
louise.battut@inserm.fr

BÉHAR Stéphane

Thermo Fisher Scientific
COURTABOEUF – FRANCE
+33 1 69 59 85 85
stephane.behar@thermofisher.com

BELLIÈRE Julie

U1048 - Équipe 12
Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 67 77 18 87
julie.belliere@inserm.fr

BEN AMARA Amira

Immunologie des Tumeurs
CRCM
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 86 97 73 44
amira.ben-amara@inserm.fr

BERTAL Nesrine

Boehringer Ingelheim
ALGER – ALGÉRIE
+21 3 77 02 97 71 0
nesrine.berthal@boehringer-ingelheim.com

BERTHELOT Karine

Immuno-oncology
Sanofi Aventis Recherche et
Développement
VITRY-SUR-SEINE – FRANCE
+33 1 58 93 38 24
karine.berthelot@sanofi.com

BERTHOU Flavien

Plateforme d'Imagerie et de Cytométrie
(PFIC)
Institut Gustave Roussy
VILLEJUIF – FRANCE
+33 142116168
flavien.berthou@gustaveroussy.fr

BESOMBES Joévin

Hématologie biologique
CHU de Clermont-Ferrand
CLERMONT-FERRAND – FRANCE
+33 4 73 75 02 00
jbesombes@chu-clermontferrand.fr

BIGOT Sylvain

Plateforme Cytométrie
CIML
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 91 26 91 25
bigot@ciml.univ-mrs.fr

BILLON Emilien

Plateforme d'immunomonitoring en
cancérologie
CRCM
MARSEILLE – FRANCE
+33 6 66 09 27 61
emilien.billon@inserm.fr

BLANC Catherine

Plateforme de Cytométrie CyPS
Sorbonne Université
PARIS – FRANCE
+33 1 40 77 95 73
catherine.blanc@sorbonne-universite.fr

BLANCHI Julie

Biologie médicale
Institut Bergonié
BORDEAUX – FRANCE
+33 5 56 33 04 53
j.blanchi@bordeaux.unicancer.fr

BLAVIGNAC Christelle

CICS-UCSA
UCA_UFR Médecine
CLERMONT-FERRAND – FRANCE
+33 4 73 17 80 88
christelle.blavignac@uca.fr

BORIES Pierre

IUCT-Oncopole
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 31 15 65 14
bories.pierre@iuct-oncopole.fr

BOSCH Steffi

IECM
Oniris
NANTES – FRANCE
+33 2 40 68 78 31
steffi.bosch@oniris-nantes.fr

BOTHUA-MOBIAN Aziliz

Plateforme de développement de tests
diagnostiques
Institut Pasteur
PARIS – FRANCE
aziliz.bothua@pasteur.fr

BOUISSET Clément

Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 32 74 45 41
clement.bouisset@inserm.fr

BOUIX Marielle

UMR LGMPA (CBAI)
AgroParisTech
GOMETZ-LA-VILLE – FRANCE
boux.marielle@orange.fr

BOULOUMIÉ Anne

Institut des maladies métaboliques et
cardiovasculaires
Inserm UMR1297
TOULOUSE – FRANCE
+33 561325642
anne.bouloumie@inserm.fr

BOURASS Sarah

ImCheck Therapeutics
MARSEILLE – FRANCE
+33 7 66 07 29 58
sarah.bourass@imcheck.fr

BOURGE Mickaël

Imagerie-Gif - Cytométrie
CNRS - I2BC
GIF-SUR-YVETTE – FRANCE
+33 1 69 82 46 30
mickael.bourge@i2bc.paris-saclay.fr

BOURGOIN Pénélope

R&D - Life Sciences
Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
pbourgoin01@beckman.com

BOUSSAND Maud

R&D - Life Sciences
Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
mboussand@beckman.com

BOYER-CLAVEL Myriam

PF MRI-IGMM-cytométrie
IGMM / CNRS
MONTPELLIER – FRANCE
+33 434359637
myriam.boyer-clavel@igmm.cnrs.fr

BRAHAM JMILI Nejja

CHU Farhat Hached De Sousse
SOUSSE – TUNISIE
+216 73 22 14 11
jmlilineja@yahoo.fr

BRECHET Damien

CLSD
Agilent Technologies
LES ULIS – FRANCE
+33 3 89 20 63 29
damien.brechet@agilent.com

BRET Caroline

Hématologie Biologique
CHU de Montpellier
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 67 33 70 31
c-bret@chu-montpellier.fr

BRIOT Anais

Inserm, Université de Toulouse
UMR1297
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 32 56 37
anais.briot@inserm.fr

BRUYER Angélique

Diag2tec
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 67 55 77 73
a.bruyer@diag2tec.com

BUCCIARELLI Florence

U1291
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 14
florence.bucciarelli@inserm.fr

BUCHAILLE Régis

BD Biosciences
LE PONT-DE-CLAIX – FRANCE
regis.buchaille@bd.com

BUNAY Julio

Centre de Recherches en Cancérologie
Inserm-UMR 1037, CNRS-UMR 5071
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 82 74 16 30
julio.bunay-noboa@inserm.fr

BURGAUD Mégane

RD Life Sciences
Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
+33 6 47 99 56 04
mbugaud@beckman.com

BURTON Olivier

Pathology
University of Cambridge
CAMBRIDGE – ROYAUME-UNI
ob240@cam.ac.uk

BUSCATO Melissa

I2MC INSERM U1297 - Équipe l'enfant
Inserm I2MC
TOULOUSE – FRANCE
melissa.buscato@inserm.fr

BUSNEL Jean-Marc

Research
Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
jeanmarc.busnel@beckman.com

CAMBORDE Laurent

Laboratoire de Recherche en Sciences
Végétales
CNRS/UT3/INP
AUZEVILLE-TOLOSANE – FRANCE
+33 5 34 32 38 24
laurent.camborde@univ-tlse3.fr

CAMPOS Lydia

Laboratoire d'hématologie
CHU - Hôpital Nord
SAINT-ÉTIENNE – FRANCE
+33 4 77 82 83 63
l.campos@sfr.fr

CANITROT Yvan

CBI MCD UMR5077
CNRS
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 55 81 84
yvan.canitrot@univ-tlse3.fr

CAOUAILLE Maxime

IPBS
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 17 59 13
maxime.caouaille@ipbs.fr

CARTAGENA GARCIA Celia

Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
ccartagena@beckman.com

CATELAIN Cyril

PFIC
Institut Gustave Roussy
VILLEJUIF – FRANCE
+33 1 42 11 51 38
cyril.catelain@gustaveroussy.fr

CAZARETH Julie

Plateau de Cytométrie
Université Côte d'Azur
VALBONNE – FRANCE
+33 4 93 95 77 83
cazareth@ipmc.cnrs.fr

CHANA Prabhjoat Singh

ThinkCyte Inc
REDWOOD CITY – USA
00447811831858
pchana@thinkcyte.com

CHAPUIS Clémence

CICS
UCA_UFR Médecine
CLERMONT-FERRAND – FRANCE
+33 4 73 17 80 88
clemence.chapuis@uca.fr

CHAPUIS Nicolas

Hématologie Biologique
Hôpital Cochin - APHP
PARIS – FRANCE
+33 1 58 41 19 50
nicolas.chapuis@aphp.fr

CHARTOIRE Dimitri

Sanofi
MARCY L'ÉTOILE – FRANCE
+33 4 37 65 65 98
dimitri.chartoire@sanofi.com

CHATELAIN Bernard

Biologie hématologique
CHU UCL Namur
YVOIR – BELGIQUE
+32 83 6 55 89 5
bernard.chatelain@gmail.com

CHAUDERON Amandine

CHU de Limoges
LIMOGES – FRANCE
+33 5 55 05 63 57
amandine.chauderon@chu-limoges.fr

CHEMLAL Djamilia

Diag2tec
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 67 55 77 73
d.chemlal@diag2tec.com

CHÉPEAUX Laure-Agnès

Plateforme CIM
IRCM
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 11 28 32 05
laure-agnes.chepeaux@inserm.fr

CHIPONT Anna

Plateforme de Cytométrie
Institut Curie
PARIS – FRANCE
+33 1 56 24 58 01
anna.chipont@curie.fr

CHOUARD Benjamin

Unilabs
COPPET – SUISSE
+41 2 27 16 20 00
benjamin.chouard@unilabs.com

CHRÉTIEN Anne-Sophie

Immunomonitoring
Institut Paoli-Calmettes
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 86 97 73 42
anne-sophie.chretien@inserm.fr

CLAËR Laetitia

U1135
Inserm U1134
PARIS – FRANCE
+33 6 38 93 43 03
laetitia.claer@inserm.fr

COINTE Sylvie

APHM
MARSEILLE – FRANCE
sylvie.cointe@univ-amu.fr

COLACIOS Céline

CRCT
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 82 74 16 16
celine.colacios@inserm.fr

COMMERE Pierre-Henri

Plateforme de cytométrie
Institut Pasteur
PARIS – FRANCE
+33 1 45 68 85 38
commere@pasteur.fr

CONSTANTIN CARRIÉ Nadège

Inserm U1037
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 82 74 17 56
nadege.carrie@inserm.fr

CONSTANTINIDES Michaël

R&D
IRMB Inserm U1183 / NK diagnostics
MONTPELLIER – FRANCE
+33 6 24 37 45 18
mconstantinides@nkdx.fr

COPET Aline

R&D
Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
acopet@beckman.com

CORRE Béatrice

Signalisation des cytokines
Institut Pasteur
PARIS – FRANCE
+33 1 45 68 88 39
beatrice.corre@pasteur.fr

COSETTE Jérémie

Plateforme Imagerie Cytométrie
Généthon
ÉVRY – FRANCE
+33 1 69 47 29 59
jcosette@genethon.fr

COURTOIS Justine

Hématologie
Université de Liège
LIÈGE – BELGIQUE
+32 4 36 64 58 0
j.courtois@uliege.be

COUURIER Céline

BIMOP
Bioaster
LYON – FRANCE
+33 4 69 85 19 22
celine.couturier@bioaster.org

CUISINIER Marine

Inserm U1037
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 82 74 17 56
marine.cuisinier@inserm.fr

DA SILVA Alicia

Microbiology
Lesaffre International
MARCQ-EN-BAROEUL – FRANCE
al.dasilva@lesaffre.com

DAMART Bertrand

Excilone
ÉLANCOURT – FRANCE
+33 1 34 86 77 01
bertrand.damart@excilone.com

DAOU Pascale

Sony Europe
WEYBRIDGE, SURREY – ANGLETERRE
pascale.daou@sony.com

DARAKDJIAN Jérôme

Agilent Technologies
LES ULIS – FRANCE
+33 1 64 53 60 00
jerome.darakdjan@agilent.com

DARMOISE Alexandre

RareCyte
TRUCHTERSHEIM – FRANCE
adarmoise@rarecyte.com

DAUGUET Nicolas

Equipe P. Coulie, Gece
Institut de Duve - UCLouvain
BRUXELLES – BELGIQUE
+32 27 64 75 79
nicolas.dauguet@uclouvain.be

DE WREEDE Anaëlle

Laboratoire d'hématologie biologique
GHE - Hospices Civils de Lyon
BRON – FRANCE
+33 4 27 85 65 84
anaelle.de-wreede@chu-lyon.fr

DEBLIQUIS Agathe

Laboratoire d'hématologie
Groupe Hospitalier de Mulhouse GHRMSA
MULHOUSE – FRANCE
+33 3 89 64 77 79
debliquisa@ghrmsa.fr

DEJEAN Anne

Centre de Physiopathologie Toulouse
Purpan
Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 13
anne.dejean@inserm.fr

DEJOU Cécile

Plateau de cytométrie MRI
IRCM - Inserm U1194
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 11 28 31 47
cecile.dejou@inserm.fr

DEKNUYDT Florence

CYTO-ICAN
Bio-Rad
MARNES-LA-COQUETTE – FRANCE
+33 6 79 51 84 56
florence_deknuydt@bio-rad.com

DELARUE Yuna

LBAI
HYPERION
BREST – FRANCE
+33 2 98 22 33 84
yuna.delarue@univ-brest.fr

DELEURME Laurent

Plateforme de cytométrie et tri cellulaire
BIOSIT
Université Rennes 1
RENNES – FRANCE
+33 2 23 23 47 55
laurent.deleurme@univ-rennes1.fr

DELGADO Ana

BIMOP
Bioaster
LYON – FRANCE
+33 4 69 84 26 00
ana.delgado@bioaster.org

DOISNE Jean-Marc

Institut Pasteur
PARIS – FRANCE
+33 1 40 61 32 09
jdoisne@pasteur.fr

DOUIN Victorine

Équipe Flames
Restore Inserm U1031
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 34 60 95 06
victorine.douin@inserm.fr

DRISS Salima

Laboratoire d'hématologie
CHU - Hôpital Nord
SAINT-ÉTIENNE – FRANCE
+33 4 77 82 83 63
labo.hematologie.hn@chu-st-etienne.fr

DUCHEZ Anne-Claire

Recherche - Inserm U1059
Etablissement Français du Sang
SAINT-PRIEST-EN-JAREZ – FRANCE
+33 6 66 73 29 52
anne-claire.duchez@efs.sante.fr

DUCREUX Julie

Pathologie Clinique
Hôpitaux Universitaires de Genève
GENÈVE – SUISSE
+41 22 37 28 560
julie.ducieux@hcuge.ch

DUNOYER Magali

Plateau Cytométrie - CERT
INSERM U1301 / CNRS UMR5070 /
Univ. P. Sabatier / EFS / ENVT
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 34 60 95 12
magali.dunoyer@inserm.fr

DUPAS Nathalie

R&D LS
Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 91 17 27 99
nathalie.dupas@beckman.com

DUPLAN-ECHE Valérie

Plateau technique de Cytométrie
Infinity - Inserm UMR1291
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 31 54 79 11
valerie.duplan@inserm.fr

DUQUESNE Sarah

CEA
FONTENAY-AUX-ROSES – FRANCE
+33 1 46 54 83 13
sarah.duquesne@cea.fr

DUROUX Boris

R&D BIOLOGIE
VIRBAC
CARROS – FRANCE
+33 4 89 97 55 40
boris.duroux@virbac.com

DUSSURGEY Sébastien

AniRA-Cytométrie
Inserm - SFR Biosciences
LYON – FRANCE
+33 4 37 28 74 62
sebastien.dussurgey@inserm.fr

DUTERTRE Charles-Antoine

Inserm U1015, «Myeloid Cell Development»
team
Institut Gustave Roussy
VILLEJUIF – FRANCE
+33 6 13 59 08 62
cadutertre@gmail.com

DUTOIT Agathe

Université Bretagne Occidentale
QUIMPER – FRANCE
+33 2 98 64 19 39
agathe.dutoit@univ-brest.fr

EL COSTA Hicham

Infinity
Inserm U1291
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 83 70
hicham.el-costa@inserm.fr

ERCEAU Lucie

Equipe 3
Valneva
SAINT HERBLAIN – FRANCE
+33 2 28 07 37 10
lucie.erceau@valneva.com

ESNAULT Magali

Valneva
SAINT HERBLAIN – FRANCE
+33 2 28 07 37 10
magali.esnault@valneva.com

FAIVRE Valérie

U1141 - Neurodiderot
PARIS – FRANCE
+33 1 40 03 19 17
valerie.favre@inserm.fr

FARCÉ Manon

Plateau technique de cytométrie
et tri cellulaire
Centre de Recherche en Cancérologie
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 82 74 16 01
manon.farce@inserm.fr

FAZILLEAU Nicolas

Infinity - Toulouse Institute for Infectious
Inserm UMR1291 CNRS 5051 UT3
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 19
nicolas.fazilleau@inserm.fr

FERRAYÉ Léa

Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 17
lea.ferraye@inserm.fr

FEURGARD Pauline

UMR5089
Institut de Pharmacologie et Biologie
TOULOUSE – FRANCE
pauline.feurgard@orange.fr

FIFANI Barbara

975
Lesaffre International
MARQUETTE LEZ LILLE – FRANCE
+33 6 76 82 29 48
b.fifani@lesaffre.com

FILBY Andrew

Newcastle University
NEWCASTLE UPON TYNE – ROYAUME-UNI
+44 7976286119
andrew.filby@ncl.ac.uk

FLOQUET Émilie

BICeL - Cytométrie
Université de Lille / UAR2014
LILLE – FRANCE
+33 3 20 62 68 25
emilie.floquet@univ-lille.fr

FOISSAC Zoé

TWB
TOULOUSE – FRANCE
zoe.foissac@inrae.fr

FOMBELLIDA LOPEZ Celine

GIGA - Uliège
LIÈGE – BELGIQUE
+32 471 64 75 87
cfombellidalopez@uliege.be

FOUILLET Antoine

Beckman Coulter
VILLEPINTE – FRANCE
afouillet@beckman.com

FRADET Magali

Plateforme de cytométrie en flux
CNRS
PARIS – FRANCE
+33 1 44 27 15 64
magalie.fradet@college-de-france.fr

FRANCOIS David

Amarok Biotechnologies
SAINT-MALO – FRANCE
+33 2 99 81 08 09
recherche@amarokbiotech.com

FREYNET Nicolas

Secteur d'Hématologie cellulaire
 APHP - GHU Henri Mondor
 CRÉTEIL – FRANCE
 +33 1 49 81 40 08
 nicolas.freynet@aphp.fr

FRIPPIAT Jean-Pol

Laboratoire Stress, Immunité, Pathohènes
 Université de Lorraine
 VANDOEUVRE-LÈS-NANCY – FRANCE
 +33 3 72 74 62 86
 jean-pol.frippiat@univ-lorraine.fr

FRITZ Shirley

Laboratoire d'hématologie
 APMH
 MARSEILLE – FRANCE
 +33 4 91 38 82 76
 shirley.fritz@ap-hm.fr

FUSARO Mathieu

Inserm U1291
 TOULOUSE – FRANCE
 mathieu.fusaro@inserm.fr

GACHENOT Martin

Plateforme RECYF
 Sorbonne Université
 ROSCOFF – FRANCE
 +33 6 17 64 81 42
 mgachenot@sb-roscoff.fr

GARCIA Cédric

Hémostase cardiovasculaire
 CHU de Toulouse
 TOULOUSE – FRANCE
 +33 561323829
 garcia.cedric@chu-toulouse.fr

GARGAROS Adrien

I2MC U1297 / Inserm
 TOULOUSE – FRANCE
 adrien.gargaros@inserm.fr

GARNIER Hugo

Infinity
 TOULOUSE – FRANCE
 +33 5 31 54 79 11
 hugo.garnier@inserm.fr

GELON Lucie

CNRS
 TOULOUSE – FRANCE
 +33 5 61 17 55 27
 lucie.gelon@ipbs.fr

GEMONET Jonathan

Proteigene
 ST MARCEL – FRANCE
 +33 2 32 64 45 45
 gemonet@proteigene.com

GERBER Léane

GHRMSA Hôpital Emile-Muller
 MULHOUSE – FRANCE
 gerber.leane.68@gmail.com

GERVAIS Alban

Beckman Coulter
 VILLEPINTE – FRANCE
 +33 1 49 90 90 00
 agervais@beckman.com

GIRARD Jean-Philippe

IPBS / CNRS, Université de Toulouse
 TOULOUSE – FRANCE
 +33 5 61 17 59 67
 jean-philippe.girard@ipbs.fr

GLASSON Yaël

IRCM
 MONTPELLIER – FRANCE
 +33 4 11 28 32 05
 yael.glasson@inserm.fr

GOROCHOV Guy

Département d'Immunologie
 CIMI Paris U135
 Sorbonne Université
 PARIS – FRANCE
 +33 142177930
 guy.gorochov@sorbonne-universite.fr

GORRET Nathalie

TBI UMR INSA CNRS5504 INRAe792
 TOULOUSE – FRANCE
 +33 5 61 55 94 71
 ngorret@insa-toulouse.fr

GORVEL Laurent

Laboratoire d'immunologie des tumeurs
 CRCM
 MARSEILLE – FRANCE
 +33 4 86 97 72 75
 laurent.gorvel@inserm.fr

GOTTARDO Raphael

LAUSANNE – SUISSE
 raphael.gottardo@chuv.ch

GRANIER Clémence

Immunology
 APHP-UPCité-INSERM
 PARIS – FRANCE
 +33 1 53 98 80 32
 clemence.granier@aphp.fr

GRANJEAUD Samuel

Bioinformatique
 Inserm - CRCM
 MARSEILLE – FRANCE
 +33 4 86 97 73 01
 samuel.granjeaud@inserm.fr

GREGORI Émilie

Standard BioTools
 PARIS – FRANCE
 emilie.gregori@standardbio.com

GUÉNONOU Sabrina

Cytek Biosciences
 SUISSE – FRANCE
 sguenounou@cytekbio.com

GUERIN Coralie

Plateforme de Cytométrie
 Institut Curie
 PARIS – FRANCE
 +33 1 56 24 58 01
 coralie.guerin@curie.fr

GUGUIN Aurélie

Plateforme de cytométrie en flux
 IMRB U955
 CRÉTEIL – FRANCE
 +33 1 49 81 36 03
 aurelie.guguin@inserm.fr

GUILLERME Jean-Baptiste

BioLegend
 PARIS – FRANCE
 jbguillerm@biolegend.com

GUILLOT Flora

Cytek Biosciences
 AMSTERDAM – PAYS-BAS
 +31 2 07 65 34 40
 fguillot@cytekbio.com

GUIRAUD Nathan

CRCT - UMR1037 INSERM
 TOULOUSE – FRANCE
 +33 6 23 71 61 19
 nathan.guiraud@inserm.fr

GUYONNET Léa

Plateforme de Cytométrie
 Institut Curie
 PARIS – FRANCE
 +33 1 56 24 58 01
 lea.guyonnet@curie.fr

GUYOT Stephane

Institut Agro Dijon
 DIJON – FRANCE
 +33 3 80 77 23 87
 stephane.guyot@agrosupdijon.fr

HABOUZIT Chloé

Cytométrie
TWB
TOULOUSE – FRANCE
+33 561705383
chloe.habouzit@inrae.fr

HAUCHAMPS Philippe

Computational Biology
Institut de Duve - UCLouvain
BRUXELLES – BELGIQUE
+32 478 50 33 18
philippe.hauchamps@uclouvain.be

HÉDOU Julien

Stanford University
PALO ALTO – ÉTATS-UNIS
+33 6 18 77 89 59
jhedou@stanford.edu

HEMAR Claire

Laboratoire Hématologie-Immunologie
Centre Hospitalier Valenciennes
VALENCIENNES – FRANCE
hemar-c@ch-valenciennes.fr

HEMON Patrice

Service Immunologie
HYPERION
BREST – FRANCE
+33 6 67 53 88 37
patrice.hemon@univ-brest.fr

HERVIER Anne

Recherche Immuno-bacterio
Sanofi vaccin, R&D
MARCY L'ETOILE – FRANCE
+33 4 37 37 98 45
anne.hervier@sanofi.com

HIRSCHAUER Claire

Hématologie
CHPF
PAPEETE – POLYNÉSIE FRANCAISE
+689 87794240
claire.hirschauer@cht.pf

HOARAU Tommy

Biopathologie
Institut Bergonié
BORDEAUX – FRANCE
+33 5 47 30 62 08
t.hoarau@bordeaux.unicancer.fr

HOAREAU-COUDERT Bénédicte

Plateforme de cytométrie CyPS
Sorbonne Université
PARIS – FRANCE
+33 1 40 77 95 73
benedicte.hoareau@sorbonne-universite.fr

HOCH Elodie

Laboratoire de microbiologie
AERIAL
ILLKIRCH – FRANCE
+33 3 88 19 15 15
e.hoch@aerial-crt.com

HOGAN ROBINSON Cassandra

Pathologie Clinique
Laboratoire de Cytométrie
Hôpitaux Universitaires de Genève
GENÈVE – SUISSE
+33 2 23 72 85 60
cassandra.hogan@hcuge.ch

HUSSAIN Idhnan

Curiox Biosystems
WOBBURN, MA – ÉTATS-UNIS
+44 7 92 61 92 40 1
idhnan@curiox.com

IDZIOREK Thierry

Oncolille
Inserm / CNRS / Université Lille
LILLE – FRANCE
+33 3 20 96 52 27
thierry.idziorek@inserm.fr

ISCACHE Anne-Laure

Plateau de cytométrie
Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 31 54 79 11
anne-laure.iscache@inserm.fr

JADEAU Cassandra

Laboratoire d'hématologie
CHU de Limoges
LIMOGES – FRANCE
+33 6 43 12 46 93
cassandra.jadeau@chu-limoges.fr

JALABER Hadrien

Institut de chimie physique
Université Paris Saclay
ORSAY – FRANCE
+33 1 69 15 44 38
hadrien.jalaber@universite-paris-saclay.fr

JOACHIM Anaïs

JC Discovery
LE GENEST-SAINT-ISLE – FRANCE
+33 7 88 72 25 89
anaïs.joachim@jc-discovery.com

JORIS Pierre

TBI, EAD8
INSA
TOULOUSE – FRANCE
+33 6 04 67 60 28
joris@insa-toulouse.fr

JUNG Benjamin

MELASPHINX
CRCT - UMR1037
TOULOUSE – FRANCE
+33 6 83 96 74 61
benjamin.jung@inserm.fr

KARI Saniya

INSERM UMR1291 – CNRS UMR5051
Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 61 46
saniya.kari@inserm.fr

KARUNANITHY Vaarany

Thermo Fisher Scientific
COURTABOEUF – FRANCE
+33 1 69 59 85 85
vaarany.karunanithy@thermofisher.com

KASSI Hermance Yolande Ebbah

Laboratoire CeDReS
Université Felix Houphouët Boigny
ABIDJAN – CÔTE D'IVOIRE
+2250708715687
bahenoh@gmail.com

KHAZEN Roxana

Inserm U1037
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 82 74 17 70
roxana.khazen@inserm.fr

KHEMICI Laeticia

Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
lkhemici@beckman.com

KHOUS Kahina

Miltenyi Biotec
PARIS – FRANCE
+33 1 56 98 16 16
kahina@miltenyi.com

KHOURIEH Joëlle

Bio-Techne
MASSY – FRANCE
joelle.khourieh@bio-techne.com

KNOSP Camille

U976
Inserm
PARIS – FRANCE
+33 1 53 98 80 40
camille.knosp@inserm.fr

KOEHLER Flora

GHRMSA Hôpital Emile-Muller
MULHOUSE – FRANCE
+33 3 89 64 77 11
koehlerflora@gmail.com

KOHIL Ossama

CRCT
TOULOUSE – FRANCE
+33 7 55 95 11 48
ossama.kohil@univ-tlse3.fr

KWAN Oswin

Hématologie
Université de Liège
LIÈGE – BELGIQUE
+32493369675
okwan@uliege.be

L'FAQIHI-OLIVE Fatima-Ezzahra

Plateforme cytométrie et tri cellulaire
Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 83 90
fatima.lfaqih@inserm.fr

LAFFONT-PRADINES Sophie

Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 562744534
sophie.laffont-pradines@inserm.fr

LAGARRIGUE Frédéric

IPBS - UMR5089
CNRS
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 17 59 78
frederic.lagarrigue@ipbs.fr

LAJUS Sophie

Toulouse Biotechnology Institute
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 55 92 17
lajus@insa-toulouse.fr

LASGI Charlène

Plateforme de Cytométrie
Institut Curie
BURES-SUR-YVETTE – FRANCE
+33 1 69 86 30 31
charlene.lasgi@curie.fr

LAURENS Claire

I2MC
Inserm UMR1297
TOULOUSE – FRANCE
+33 561325626
claire.laurens@inserm.fr

LE GARFF-TAVERNIER Magali

Service d'Hématologie Biologique
Hôpital Pitié-Salpêtrière
PARIS – FRANCE
+33 1 42 16 02 66
magali.legarff@aphp.fr

LE VERN Yves

UMR Infectiologie et Santé Publique
Équipe IMI
INRAe
NOUZILLY – FRANCE
+33 2 47 42 78 74
yves.levern@inrae.fr

LECOLANT Solène

Hématologie Biologique
Institut Gustave Roussy
VILLEJUIF – FRANCE
+33 6 20 77 88 02
solene.lecolant@aphp.fr

LEFRANC Céline

Immuno-oncology
Sanofi Aventis Recherche et
Développement
VITRY-SUR-SEINE – FRANCE
+33 1 58 93 85 72
celine.lefranc@sanofi.com

LEMAIRE Clémentine

BD Biosciences
FRANCE
clementine.lemaire@bd.com

LENFANT Françoise

Inserm U1297 - I2MC
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 31 22 40 93
francoise.lenfant@inserm.fr

LEPERCQ Pascale

plateau écologie microbienne
INSA-TBI Toulouse
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 55 97 87
lepercq@insa-toulouse.fr

LEROY Laura

Inserm CRCT
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 82 74 16 17
laura.leroy@inserm.fr

LESTRADE Delphine

Cytométrie et tri cellulaire
Toulouse White Biotechnology
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 28 52 68
delphine.lestrade@inrae.fr

LHERMITTE Ludovic

Oncohématologie biologique
Necker Enfants Malades
PARIS – FRANCE
+33 6 03 62 54 81
ludovic.lhermitte@aphp.fr

LOCONTE Luisa

U932, Inserm
Institut Curie
PARIS – FRANCE
+33 1 56 24 67 16
luisa.loconte@curie.fr

LOHMANN Eugénie

Inserm
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 86 97 73 02
eugenie.lohmann@inserm.fr

LOUIS Hugnette

UAR2008 / US40
Université de Lorraine
VANDOEUVRE-LÈS-NANCY – FRANCE
+33 3 72 74 65 86
hugnette.louis@univ-lorraine.fr

LOUIS Kevin

Néphrologie et Transplantation
Inserm U976
PARIS – FRANCE
+33 6 79 95 42 58
kevs_louis@hotmail.com

MACHURA Amelie

Diag2tec
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 67 55 77 73
a.machura@diag2tec.com

MACIOROWSKI Zofia

PARIS – FRANCE
zosiamaciorowski@gmail.com

MADIONA Karine

Imagerie-Gif / Plateforme de Cytométrie
I2BC - CNRS
GIF-SUR-YVETTE – FRANCE
+33 1 69 82 46 30
karine.madiona@i2bc.paris-saclay.fr

MALERGUE Fabrice

Life Sciences
Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
fmalergue@beckman.com

MALNOU Cécile

Infinity - Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 11
cecile.malnou@inserm.fr

MANARANCHE Jeanne

CNRS
Laboratoire de Chimie de Coordination
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 17 58 69
jeanne.manaranche@lcc-toulouse.fr

MANDONNET Audrey

Infinity - Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 34
audrey.mandonnet@inserm.fr

MAREC Nadège

LBAI
HYPERION
BREST – FRANCE
+33 2 29 02 01 56
nadege.marec@univ-brest.fr

MARGARIDO PEREIRA Tania

Équipe 4 Melasphinx
CRCT
TOULOUSE – FRANCE
+33 7 87 89 92 07
tania.margarido-pereira@inserm.fr

MARQUET Florian

vivo
Servier
GIF-SUR-YVETTE – FRANCE
+33 6 12 72 16 24
florian.marquet@servier.com

MARTIN Elodie

Laboratoire d'Immunologie
CHU de Toulouse
TOULOUSE – FRANCE
immunorg.cmf@chu-toulouse.fr

MARTINET Ludovic

CRCT
Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 82 74 17 57
ludovic.martinet@inserm.fr

MAS-OREA Xavier

Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 6 82 35 60 16
xavier.mas-orea@inserm.fr

MAYEMI Bienvenu

Sysmex France
VILLEPINTE – FRANCE
+33 1 48 17 01 90
mayemi.bienvenu@sysmex.fr

MAYOL Jean-François

Flow Cytometry Facility
Université de Lusanne
EPALINGES – SUISSE
+41216925971
jean-francois.mayol@unil.ch

MEGHRAOUI-KHEDDAR Aïda

AMK Biotech
SOPHIA - ANTIPOLIS – FRANCE
+33 4 92 38 68 91
meghraoui@amkbiotech.fr

MENUT Paul

In Vitro Biology
Evotec
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 34 63 37 02
paul.menut@evotec.com

MERCADE Myriam

Plateau d'écologie Microbienne
Toulouse Biotechnology Institute - INSA
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 55 97 87
mercade@insa-toulouse.fr

MEZRIGUI Rihem

Laboratoire d'hématologie
CHU FB Monastir
MONASTIR – TUNISIE
21652023615
rihem_mez@yahoo.fr

MICHAUD Henri-Alexandre

Plateforme CIM
IRCM
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 67 61 24 28
henri-alexandre.michaud@inserm.fr

MILLET WALLISKY Ewa

Beckman Coulter Life Science
MARSEILLE – FRANCE
+33 6 35 22 02 83
emilietwallisky@beckman.com

MIONNET Cyrille

Plateforme Cytométrie
CIML
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 91 26 91 16
mionnet@ciml.univ-mrs.fr

MODENEL Christelle

CHU de Limoges
LIMOGES – FRANCE
+33 5 55 05 55 55
christelle.modenel@chu-limoges.fr

MOLENDI-COSTE Olivier

PLBS US41
Inserm
LILLE – FRANCE
olivier.molendi-coste@inserm.fr

MONIER Serge

ImaFlow - Plateforme de Cytométrie
U1231
DIJON – FRANCE
+33 3 80 39 34 67
smonier@u-bourgogne.fr

MONSONIS Frédéric

R&D Life Sciences
Beckman Coulter - Immunotech
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 91 17 35 41
fmonsonis@beckman.com

MOREAUX Jérôme

Faculté de Médecine
Université de Montpellier
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 67 33 79 03
jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

MORENO-SABATER Alicia

Sorbonne Université-APHP
PARIS – FRANCE
+33 1 42 17 75 17
alicia.moreno-sabater@sorbonne-universite.fr

MOUDOMBI Lyvia

Equipe Caux
Centre de Recherche en Cancérologie
Centre Léon Bérard
LYON – FRANCE
+33 4 69 85 60 39
lyvia.moudombi@lyon.unicancer.fr

MURAT Virginie

La Gazette du Laboratoire
RIORGES – FRANCE
+33 4 77 72 09 65
virginie.murat@gazettelabo.fr

NAKHLE Jean

Université de Toulouse - INSERM 1301
CNRS 5070 - EFS - ENVT
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 34 60 35 13
jean.nakhle@inserm.fr

NÄSER Emmanuelle

PF cytométrie
IPBS / CNRS
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 17 58 61
emmanuelle.naser@ipbs.fr

NAVARRO Florent

BD Biosciences
LE PONT-DE-CLAIX – FRANCE
+33 4 76 68 32 98
florent_navarro@europe.bd.com

NIVAGGIONI Vanessa

Laboratoire Hématologie
APHM
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 91 38 82 45
vanessa.nivaggioni@ap-hm.fr

NKODIA Axelle

LICL - Plateforme P3I
Centre Léon Bérard
LYON – FRANCE
+33 4 78 78 28 28
axelle.nkodia@lyon.unicancer.fr

NOGUEROL Julie

Toulouse Institute for Infectious and
Inflammatory
Inserm U1291 - CNRS U5051
University Toulouse III
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 83 82
julie.noguerol@inserm.fr

NOURIKYAN Julien

AltraBio SAS
LYON – FRANCE
+33 4 26 84 69 63
julien.nourikyan@altrabio.com

NOVAULT Sophie

CB-UTeCHS
Institut Pasteur
PARIS – FRANCE
+33 1 45 68 82 31
sophie.novault@pasteur.fr

OMHOVER Lysiane

Aerial
ILLKIRCH – FRANCE
+33 3 88 19 15 15
l.omhover@aerial-crt.com

OUK Catherine

UAR2015 CNRS - US42 Inserm
Univ. Limoges
LIMOGES – FRANCE
catherine.ouk@unilim.fr

OUKID Salima

Hématologie
Société Algérienne d'Hématologie et de
Transfusion Sanguine (SAHTS)
BLIDA – ALGÉRIE
+213 5 42 83 65 80
oukids2020@gmail.com

PACHECO Antoine

Département marketing
Beckman Coulter
VILLEPINTE – FRANCE
+33 1 49 90 91 44
apacheco@beckman.com

PARIZOT Christophe

Département d'Immunologie
GH Sorbonne Université
CHAMPS-SUR-MARNE – FRANCE
+33 1 42 17 74 92
christophe.parizot@aphp.fr

PÉRALIS Corine

Infinity
INSERM UMR1291 - CNRS UMR5051
UPS III
TOULOUSE – FRANCE.
+33 5 62 74 86 53
corine.perals@inserm.fr

PERNET Nicolas

Plateforme ImaFlow
Inserm - UMR1231
DIJON – FRANCE
+33 3 80 39 34 67
nicolas.pernet01@u-bourgogne.fr

PEROCESCHI Romain

UMR 1291
Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 12
romain.peroceschi@inserm.fr

PETIT Vincent

Metafora Biosystems
PARIS – FRANCE
+33 9 61 62 65 17
vincent.petit@metafora-biosystems.com

PIJPSTRA Pauline

INSA
TOULOUSE – FRANCE
+33 6 30 19 93 25
pijpstra@insa-toulouse.fr

PINAR Can

Cytolytics
TUEBING – ALLEMAGNE
+49 176 24271245
can.pinar@cytolytics.de

PITOISET Fabien

Cytek Biosciences
AMSTERDAM – PAYS-BAS
fpitoiset@cytekbio.com

PLANTUREUX Céleste

Équipe 11 Kroemer
Métabolisme, cancer, immunité
Inserm UMRS 1138 - CRC
PARIS – FRANCE
celeste@plantureux.fr

PLANTUREUX Léa

Plateforme AMUTICYT
C2VN
MARSEILLE – FRANCE
+33 618924890
lea.plantureux@univ-amu.fr

POCHARD Pierre

Laboratoire d'Immunologie
HYPERION
BREST – FRANCE
+33 2 98 22 33 84
pierre.pochard@univ-brest.fr

POPOFF Dimitri

CIML
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 91 26 91 16
popoff@ciml.univ-mrs.fr

POTON Perrine

UMR PEGASE
INRAe
ST GILLES – FRANCE
+33 223485987
perrine.poton@inrae.fr

PRIME Morgane

UMR 1291
Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 36
morgane.prime@inserm.fr

RAFFIN Florent

DPRT/U.AB
Institut de Recherche Biomédicale
des Armées
BRÉTIGNY-SUR-ORGE – FRANCE
+33 1 78 65 13 25
raffin.florent.irba@gmail.com

RAGGUENEAU Victoria

Hématologie
Centre Hospitalier de Versailles
LE CHESNAY – FRANCE
+33 6 87 52 77 86
vraggueneau@ght78sud.fr

RAJARAM Sigeeta

ThinkCyte Inc
REDWOOD CITY – USA
sigeetar@thinkcyte.com

RAMEAU Philippe

Plate-forme imagerie et Cytométrie
UMS23 / 3655
Institut Gustave Roussy
VILLEJUIF – FRANCE
+33 1 42 11 51 38
philippe.rameau@gustaveroussy.fr

RAYNAUD Adrien

Life Sciences
Beckman Coulter
VILLEPINTE – FRANCE
araynaud@beckman.com

REBER Laurent

INSERM U1291
Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 15 84 30
laurent.reber@inserm.fr

RENOUD Marie-Laure

CERT - Plateau Cytométrie
Restore
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 34 60 95 12
marie-laure.renaud@inserm.fr

REQUIRAND Guilhem

Laboratoire suivi des thérapies innovantes
CHU Montpellier
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 67 33 04 90
guilhem.requirand@igh.cnrs.fr

REY Lea

IRSD U1220 - Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 6 80 84 31 53
lea.rey@inserm.fr

RIAL-SEBBAG Emmanuelle

CERPOP UMR 1295
Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 14 56 16
emmanuelle.rial@univ-tlse3.fr

RIANT Élodie

Plateau de cytométrie
Inserm - I2MC
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 31 22 41 61
elodie.riant@inserm.fr

RIBES Agnes

Laboratoire d'Hématologie
CHU Toulouse
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 32 28 36
ribes.a@chu-toulouse.fr

RICHARME Thomas

Équipe 13
CRCT
TOULOUSE – FRANCE
+33 7 82 66 72 08
thomas.richarme@inserm.fr

RICHAUD Manon

Immunologie des tumeurs
CRCM
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 86 97 73 63
manon.richaud@inserm.fr

RIGAUD Bineta

Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 6 76 43 68 42
bineta.rigaud@yahoo.fr

RITACCO Caroline

Institut des Neurosciences de Montpellier
MONTPELLIER – FRANCE
+33 6 17 57 50 18
caroline.ritacco@inserm.fr

RODRIGUEZ Celine

Centre de Recherche en Cancérologie
Centre Léon Bérard
LYON – FRANCE
+33 4 78 78 29 64
celine.rodriguez@lyon.unicancer.fr

ROSENTHAL Alessandra

Laboratoire d'Immunologie
CHU de Nice
NICE – FRANCE
+33 4 92 03 56 44
rosenthal.m@chu-nice.fr

ROUQUIÉ Nelly

Équipe R. Lesourne - L.Dupré
Infinity
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 41
nelly.rouquie@inserm.fr

ROUSSEAUX Madeleine

Laboratoire d'hématologie
Cliniques Universitaires Saint-Luc
BRUXELLES – BELGIQUE
+32 2 76 48 11 9
madeleine.rousseau@uclouvain.be

ROUSSEL Mikael

Service d'Hématologie Biologique
CHU Pontchaillou - Inserm U1236
RENNES – FRANCE
+33 2 99 28 91 42
mikael.rousseau@chu-rennes.fr

ROUVIERE Marie-Sarah

Plateforme Immunomonitoring en
Cancérologie
Institut Paoli-Calmettes
MARSEILLE – FRANCE
+33 4 86 97 73 46
marie-sarah.rouviere@inserm.fr

RUCKEBUSCH Odile

Plateforme de cytométrie en flux
IMRB U955
CRÉTEIL – FRANCE
+33 1 49 81 36 03
odile.ruckebusch@inserm.fr

SAADA Véronique

Laboratoire d'Hématologie
Institut Gustave Roussy
VILLEJUIF – FRANCE
+33 1 42 11 40 67
veronique.saada@gustaveroussy.fr

SAKALIAN Oliver

Laboratoire d'hématologie
CHU de Bordeaux
PESSAC – FRANCE
+33 7 77 03 78 89
oliver.sakalian@chu-bordeaux.fr

SANATINE Peggy

Imagerie cytométrie
Généthon
ÉVRY – FRANCE
+33 1 69 47 11 73
psanatine@genethon.fr

SARRAZIN Amélie

MRI-IGH-cyto
CNRS BioCampus
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 34 35 99 90
amelie.sarrazin@igh.cnrs.fr

SAULOU-BÉRIION Claire

Université Paris-Saclay, INRAE
AgroParisTech - UMR SayFood
PALAISEAU – FRANCE
+33 1 89 10 12 28
claire.saulou@agroparistech.fr

SAUSSET Alix

UMR Infectiologie et Santé Publique
Équipe IMI - INRAE
NOUZILLY – FRANCE
+33 2 47 42 78 74
alix.sausset@inrae.fr

SCALBERT-STERLIN Delphine

Assistance Publique Hôpitaux de Paris
PARIS – FRANCE
+33 1 42 17 75 18
delphine.sterlin@aphp.fr

SCHMUTZ Sandrine

Plateforme de cytométrie
Institut Pasteur
SARTROUVILLE – FRANCE
+33 1 45 68 95 13
sandrine.schmutz@pasteur.fr

SEKIAS Myriam

Inserm
MARSEILLE – FRANCE
+33 7 68 50 81 25
sekias@ciml.univ-mrs.fr

SEQUEIRA Anabelle

Plateforme ImaFlow
Université de Bourgogne
DIJON – FRANCE
+33 3 80 39 34 67
anabelle.legrand@u-bourgogne.fr

SEVERIN Sonia

I2MC
TOULOUSE – FRANCE
+33 6 63 26 79 67
sonia.severin@inserm.fr

SIMONI Yannick

Inserm U1016
PARIS – FRANCE
+33 1 40 51 65 40
yannick.simoni@inserm.fr

STUANI Lucille

Centre de Recherches en Cancérologie
IRCM U1194
MONTPELLIER – FRANCE
+33 4 11 28 32 02
lucille.stuani@inserm.fr

TABIASCO Julie

Inserm U1291
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 45 37
julie.tabiasco@inserm.fr

THOMAS Vincent

Lallemand Health Solutions
BLAGNAC – FRANCE
+33 6 07 05 40 13
vthomas@lallemand.com

TICCHIONI Michel

Laboratoire d'immunologie
CHU de Nice
NICE – FRANCE
+33 4 92 03 55 02
ticchioni.m@chu-nice.fr

TORRES Romain

Équipe 10
Infinity - Inserm
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 62 74 83 82
romain.torres@inserm.fr

TOUMI Nourelhouda

Laboratoire Hématologie Biologique
Hôpital Enfants Bechir Hamza
TUNIS – TUNISIE
+21 6 71 15 16 08
pnourelhouda@gmail.com

TREINER Emmanuel

Immunologie
CHU Toulouse
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 61 77 61 37
treiner.e@chu-toulouse.fr

TRUNET Clément

LUBEM
Université de Brest
QUIMPER – FRANCE
+33 2 98 64 19 51
clement.trunet@univ-brest.fr

VALENTIN Nicolas

Lab 3018 - Institut Jacques Monod
CNRS / UMR7592
PARIS – FRANCE
+33 1 57 27 81 52
nicolas.valentin@ijm.fr

VAN TILBEURGH Matthieu

IDMIT
CEA_IDMIT
FONTENAY-AUX-ROSES – FRANCE
+33 1 46 54 83 13
matthieu.van-tilbeurgh@cea.fr

VAN WASSENHOVE Jerome

ICM
PARIS – FRANCE
+33 6 46 06 35 62
vanwassenhove.jerome@gmail.com

VANWINGE Céline

Giga Flow Cytometry Platform
Université de Liège
LIÈGE – BELGIQUE
04 36 62 57 9
cvanwinge@uliege.be

VERGEZ François

Laboratoire d'immunologie
Inserm U1037
CHU Toulouse
AUTERIVE – FRANCE
+33 5 31 15 61 66
vergez.francois@iuct-oncopole.fr

VERGNOLLE Inès

Laboratoire d'hématologie
CHU Toulouse
TOULOUSE – FRANCE
+33 531156167
vergnolle.ines@iuct-oncopole.fr

VINIT Angélique

Plateforme de Cytométrie CyPS
Sorbonne Université
PARIS – FRANCE
+33 1 40 77 95 73
angelique.vinit@sorbonne-universite.fr

VRABLIKOVA Barbora

Plateforme de cytométrie en flux
IMRB U955
CRETEIL – FRANCE
+33 149813603
barbora.vrablikova@inserm.fr

WAGNER-BALLON Oriane

Département d'Hématologie et
Immunologie biologique
APHP - GHU Henri Mondor
CRÉTEIL – FRANCE
+33 1 49 81 28 80
orianne.wagnerballon@aphp.fr

ZAKAROFF-GIRARD Alexia

UMR1297 I2MC
Inserm Université Paul Sabatier
TOULOUSE – FRANCE
+33 5 31 22 41 61
alexia.zakaroff@inserm.fr

ZARROUK Hager

Laboratoire Hématologie Biologique
Hôpital Enfant Bechir Hamza
TUNIS – TUNISIE
97478902
zarrouk.hager@yahoo.fr

ZOUINE Atika

Plateforme cytométrie
UAR Tbm Core 3427 - US005
BORDEAUX – FRANCE
+33 5 57 57 95 82
atika.zouine@inserm.fr

26^e CONGRÈS ANNUEL DE L'ASSOCIATION FRANÇAISE DE CYTOMÉTRIE

15-17 novembre



Association Française de Cytométrie

CYTOMÉTRIE 2023



Centre de Congrès Pierre Baudis TOULOUSE

LISTE DES EXPOSANTS ET SPONSORS



Exposants - sponsors

AFC

Stand 31

3 boulevard Saint-Germain
75005 PARIS – FRANCE
contact@afcytometrie.fr
www.afcytometrie.fr

Agilent Technologies

Stand 23

Agilent fournit des réponses fiables qui aident nos clients à répondre à leurs enjeux scientifiques et à accroître les performances de leurs laboratoires et à améliorer leur qualité de vie.

Pars Technopolis - ZA Courtaboeuf
3 avenue du Canada
91940 LES ULIS – FRANCE
+33 1 64 53 60 00
customercare_france@agilent.com
www.agilent.com

BD

Stand 10

BD est une entreprise mondiale de technologie médicale qui vise à faire progresser le monde de la santé en améliorant la découverte mondiale, les diagnostics et l'administration des ventes.

11 rue Aristide Bergès
BP 4
38800 LE PONT-DE-CLAIX – FRANCE
+33 4 76 68 32 98
melanie.tupin@bd.com
www.bd.com

Beckman Coulter

Stand 30

Beckman Coulter Life Sciences se consacre au développement et à la fourniture de technologies et d'équipements avancés pour la recherche et la découverte afin d'explorer de nouvelles méthodes de traitement.

22 avenue des Nations - Immeuble le Rimbaud
93420 VILLEPINTE – FRANCE
+33 1 49 90 90 00
beckman_france@beckman.com
www.beckman.fr

Bio-Techne

Stand 32

Bio-Techne empowers researchers in Life Science and Clinical Diagnostics by providing high-quality reagents, instruments, custom manufacturing, and testing services.

19 rue Louis Delourmel - CS 49228
35230 NOYAL-CHÂTILLON-SUR-SEICHE
CEDEX 9 – FRANCE
+33 2 99 35 19 36
info.fr@bio-techne.com
www.bio-techne.com

BioLegend

Stand 40

BioLegend creates world-class, cutting-edge antibodies and reagents across a diverse set of applications-from flow cytometry to immunoassays, to multiomics. Discover the BioLegend difference at www.BioLegend.com.

38 rue de Berri
75008 PARIS – FRANCE
france@biolegend.com
www.biolegend.com

Curiox Biosystems

Stand 41

Curiox Biosystems is committed to enabling accurate biological analysis through automation. That's why Curiox created Laminar Wash technology, the only sample prep method that eliminates centrifugation and the problems it introduces.

Samsung Harrington IT Tower #202,
#204-213 9 Gil 41 Digital-Ro, Geumchun-Gu
08511 SÉOUL – CORÉE DU SUD
sales@curiox.com
www.curiox.com

Cytex Biosciences

Stand 6

Reconnu comme expert en cytométrie en flux spectrale et par imagerie permettant aux utilisateurs d'aller encore plus loin dans leurs recherches.

Paasheuvelweg 25, Tower C5
1105BP AMSTERDAM – THE NETHERLANDS
+31 2 07 65 34 40
customerserviceemea@cytekbio.com
www.cytekbio.com

Cytolytics

Stand 3

Cytolytics propose un logiciel automatisé basé sur l'apprentissage automatique pour l'analyse de cytométrie en flux. Notre logiciel Cytolution rend votre analyse rapide, simple et fiable.

Karlstrasse 3
72072 TÜBINGE – GERMANY
+49 1 76 24 27 12 45
info@cytolytics.de
www.cytolytics.de

EasyPanel

Stand 1

Software pour Design Automatisé de Panels de cytométrie & de management intelligent d'inventaire/stock d'anticorps.

235 Albany Street
02139 CAMBRIDGE – USA
+1 617 430 51 94
omar_zid@flow-cytometry.net
flow-cytometry.net

Excilone

(Particle Metrix distributor)

Stand 56

Distributeur exclusif en France de l'analyseur multiparamétrique de nanoparticules ZetaView, de chez Particle Metrix GmbH. Le ZetaView permet l'analyse de la taille, de la concentration et du potentiel Zeta de particules en suspension, ainsi que des mesures en fluorescence jusqu'à 10 canaux.

Parc Eculide
6 rue Blaise Pascal
78990 ÉLANCOURT – FRANCE
+33 1 34 86 77 01
adv@excilone.com
www.excilone.com

METAflow by Metafora

Stand 4

We leverage our unique cell metabolism and AI-powered data analysis platforms to turn disruptive single-cell technologies into impactful solutions that improve human health.

29 rue du Faubourg Saint Jacques
75014 PARIS – FRANCE
+33 9 61 62 65 17
contact@metafora-biosystems.com
www.metafora-biosystems.com

Miltenyi Biotec

Stand 50

Société de Biotechnologie, leader dans le domaine de la séparation cellulaire, intervenant novateur en cytométrie en flux, culture cellulaire, biologie moléculaire et préparation d'échantillon et microscopie.

10 rue Mercoeur
75011 PARIS – FRANCE
+33 1 56 98 16 16
macsfr@miltenyi.com
www.miltenyibiotec.com

Ozyme

Stand 22

Spécialiste depuis 1984 de la fourniture de produits et services pour les laboratoires de recherche. Ozyme sélectionne et propose des gammes issues des plus grands noms de la biologie cellulaire, de l'immunologie et de la biologie moléculaire.

6 Boulevard Georges Marie Guynemer
ZAC Charles Renard, Bât. G
78120 SAINT-CYR-L'ÉCOLE – FRANCE
+33 1 34 60 24 24
info@ozyme.fr
www.yris.ozyme.fr

Proteigene**Stand 20**

Proteigene est une société de distribution créée en 1999 spécialisée dans la vente d'équipements et de réactifs en Biologie cellulaire, Génomique, Protéomique et Métabolomique.

7 rue Léo Lagrange
BP 1134
27950 SAINT-MARCEL – FRANCE
+33 2 32 64 45 45
info@proteigene.com
www.proteigene.com

Proteintech**Stand 51**

Proteintech est un leader dans le développement et la production d'anticorps, de kits d'immuno-essais, de protéines et de nanobodies.

Transmission (6th floor)
6 Atherton Street
M3 3GS MANCHESTER – UK
+44 161 839 3007
europe@ptglab.com
www.ptglab.com

RareCyte**Stand 53**

RareCyte fournit des produits et services Precision Biology™ pour la découverte, la recherche translantionnelle et le diagnostic clinique.

2601 4th Avenue
WA 98121 SEATTLE – USA
+ 1 206 455 9092
info@rarecyte.com
https://rarecyte.com

Sony Europe B.V**Stand 24**

SONY EUROPE B.V. est un fournisseur de solutions de cytométrie en flux (instruments, logiciel d'analyse et anticorps). SONY est pionnier en cytométrie spectrale et continue d'innover dans ce secteur d'activité.

The Heights, Brooklands
KT130XW WEYBRIDGE - SURREY – UK
+44 4 083 004 298
SESSalesSupport@sony.com
www.sonybiotechnology.com

Standard BioTools**Stand 34**

Standard BioTools, anciennement connu sous le nom de Fluidigm®, offre un portefeuille établi de technologies essentielles dans le domaine de la cytométrie en flux et l'imagerie qui permettent aux clients de développer et d'accélérer leur recherche en fournissant des résultats cohérents, fiables et reproductibles.

43-47 avenue de la Grande-Armée
75116 PARIS – FRANCE
+33 1 60 92 42 40
education.team@standardbio.com
www.standardbio.com/

Sysmex France**Stand 27**

Sysmex France, leader en hématologie, propose une gamme complète de FCM, de la préparation automatisée des panels et échantillons, à l'analyse. Sysmex est présent aussi en Industrie.

ZAC Paris Nord 2
22 avenue des Nations
93420 VILLEPINTE CEDEX – FRANCE
+33 1 48 17 01 90
info@sysmex.fr
www.sysmex.fr

Thermo Fisher Scientific / Life Technologies**Stand 2**

Thermo Fisher Scientific est le leader mondial au service de la science. Notre mission est de permettre à nos clients de rendre le monde plus sain, plus propre et plus sûr. Nous aidons nos clients à accélérer la recherche des sciences de la vie, à relever les défis analytiques complexes, à améliorer les diagnostics des patients, à livrer des médicaments au marché et à augmenter la productivité des laboratoires.

3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park
UK PA4 9RF PAISLEY – SCOTLAND
+33 7 86 99 11 58
guerric.epron@thermofisher.com
www.thermofisher.com

Vizgen**Stand 54**

Vizgen is dedicated to pioneering the next generation of genomics, providing tools that demonstrate the possibilities of in situ single-cell spatial genomics, setting the standard for the spatial genomics field.

61 Moulton Street
02138 CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS – USA
+1 833-222-8206
william.amoyal@vizgen.com
www.vizgen.com

Sponsors**Alexion Pharma France**

www.alexionpharma.com

InvivoGen

www.invivogen.com

Sociétés savantes partenaires et partenaires académiques**CytHem**

www.cythem.fr

FSEV

www.fsev.fr

Genotoul**Genopole Toulouse**

www.genotoul.fr

Genotoul TRI

https://trigenotoul.com

SFI

https://immunology.fr/fr/

SFM

www.sfm-microbiologie.org

Partenaires sponsors publics / privés**La Région Occitanie / Pyrénées-Méditerranée**

www.laregion.fr

Ambiotis

www.ambiotis.com

Genotoul**Genopole Toulouse**

www.genotoul.fr

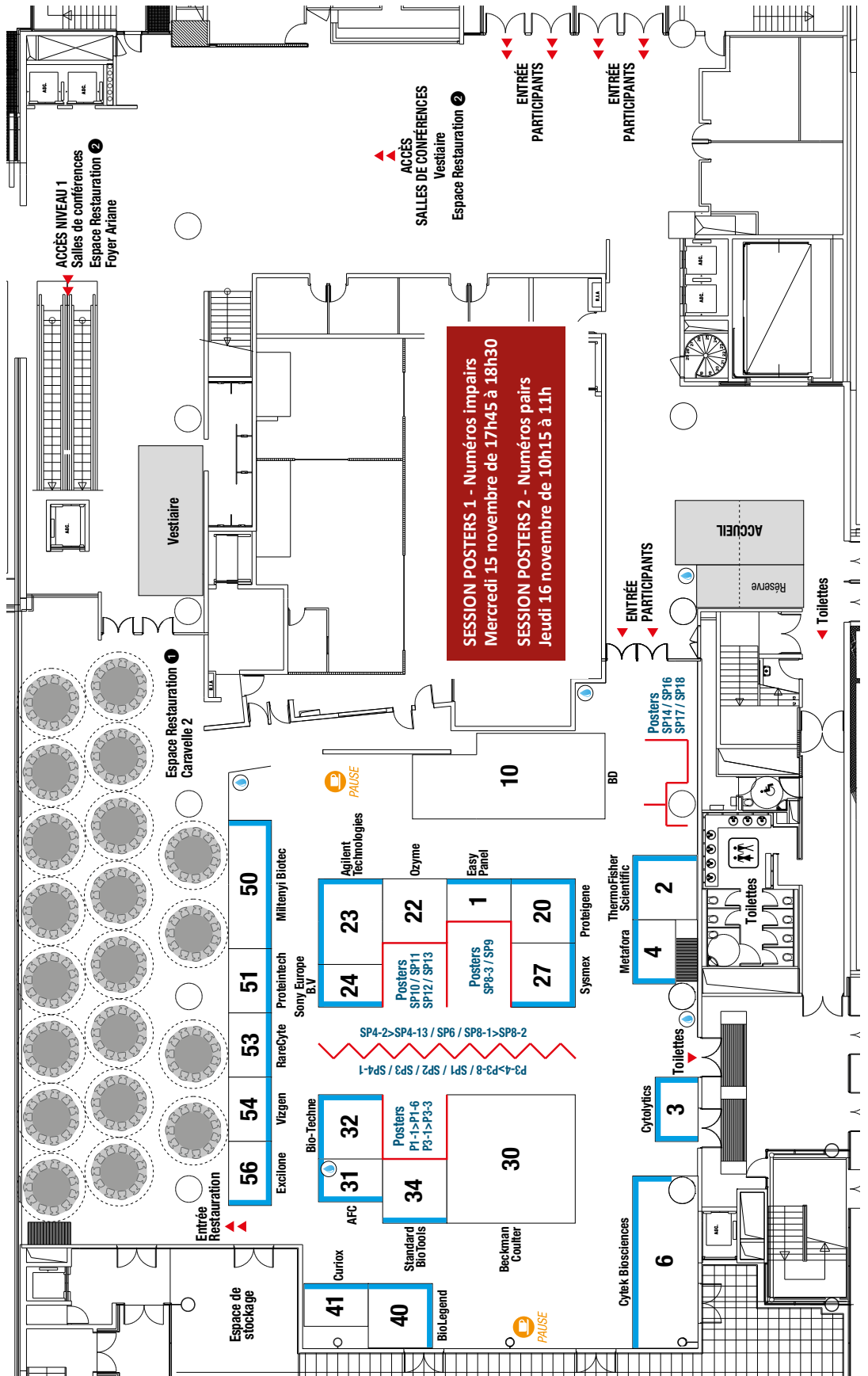
Presse**La gazette du laboratoire**

www.gazettelabo.fr

CENTRE DE CONGRÈS DE TOULOUSE - ESPACES CARAVELLE 1&2 - NIV. 1

Liste des stands

AFC	STAND 31	CURIOX	STAND 41	MILITENYI BIOTECH	STAND 50	STANDARD BIOTOOLS	STAND 34
AGILENT TECHNOLOGIES	STAND 23	CYTEK BIOSCIENCES	STAND 6	OZYME	STAND 22	SYSMEX	STAND 27
BD	STAND 10	CYTOLYTICS	STAND 3	PROTEIGENE	STAND 20	THERMOFISHER SCIENTIFIC	STAND 2
BECKMAN COULTER	STAND 30	EASY PANEL	STAND 1	PROTEINTECH	STAND 51	VIZGEN	STAND 54
BIO-TECHNE	STAND 32	EXCLONE	STAND 56	RARECYTE	STAND 53		
BIOLEGEND	STAND 40	METAFORA	STAND 4	SONY EUROPE B.V.	STAND 24		

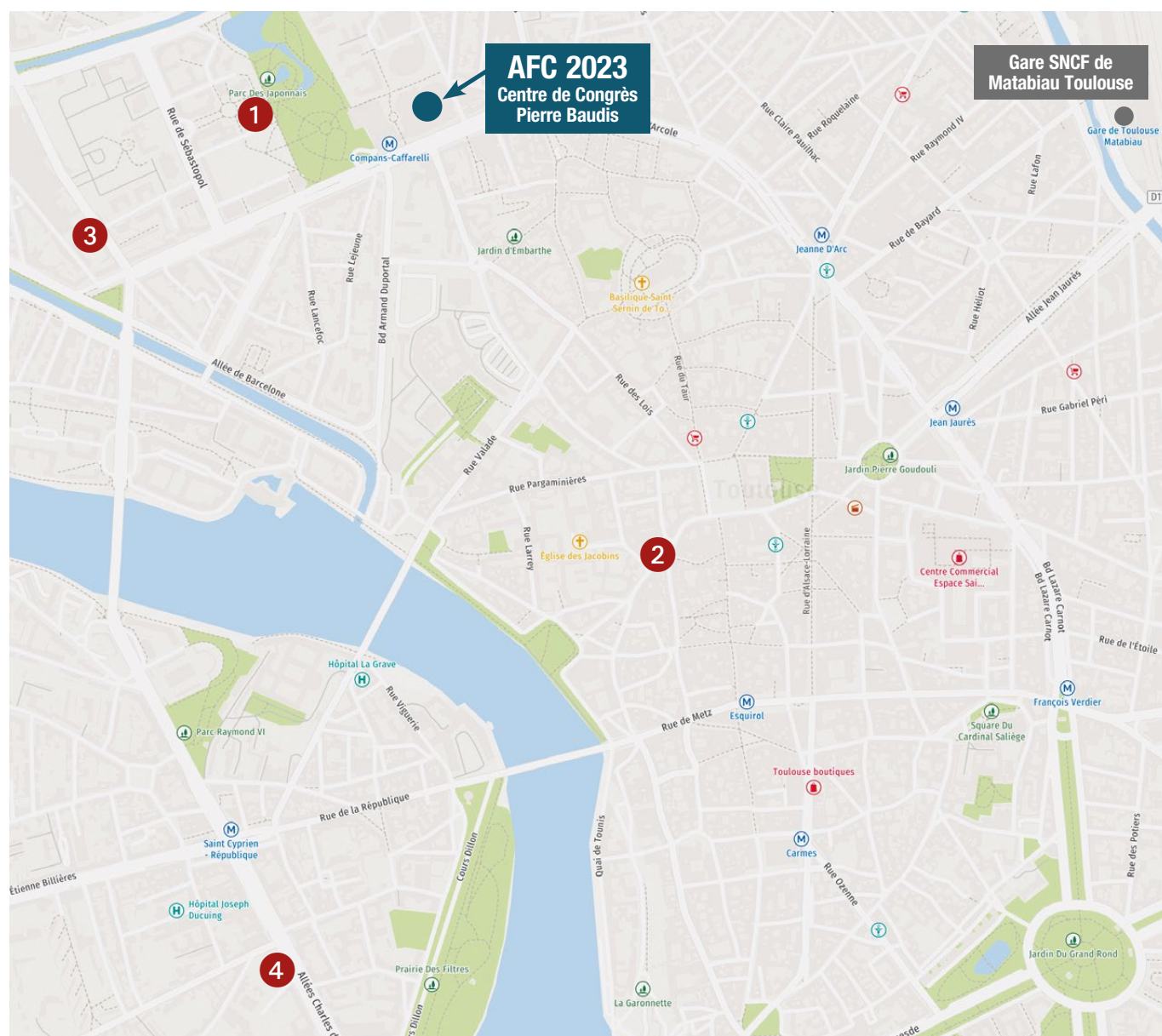


SESSION POSTERS 1 - Numéros impairs
 Mercredi 15 novembre de 17h45 à 18h30

SESSION POSTERS 2 - Numéros pairs
 Jeudi 16 novembre de 10h15 à 11h

[Retour sommaire](#)

PLAN DE SITUATION DES HÔTELS - TOULOUSE



1 Novotel Toulouse Centre Compans Caffarelli ****

Situé à 5 minutes à pied (400 m) du Centre de Congrès Pierre Baudis. Parking privé : 15 € / 24h.



2 Plaza Hotel Toulouse Capitole ****

Situé à 15 minutes à pied (1,1 km) ou 14 minutes en bus du Centre de Congrès Pierre Baudis. Parking privé : 22 € / 24h.



3 Apart'hôtel Odalys City Centre Compans Caffarelli ***

Situé à 10 minutes à pied (850 m) du Centre de Congrès Pierre Baudis. Parking public "Place de l'Europe" à proximité.



4 Hôtel Gascogne**

Situé à 16 minutes en métro (2,1 km) du Centre de Congrès Pierre Baudis. Parking privé gratuit.

