

13^{EME} JOURNEES STEPHANOISES DE CYTOMETRIE ET IMAGERIE CELLULAIRE ET TISSULAIRE (CYTIMA 2012)

Mercredi 6 et Jeudi 7 Juin 2012

Château de Bouthéon

Rue Mathieu de Bourbon, 42160 Andrézieux Bouthéon

Organisé par :

Pôle de Biologie-Pathologie, Hôpital Nord, CHU de Saint-Etienne

Laboratoire d'Immunologie

Laboratoire d'Hématologie

Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

Claude LAMBERT

Lydia CAMPOS

Michel PEOC'H

Ecole Nationale Supérieure des Mines, Saint-Etienne

Centre Ingénierie et Santé

(LPMG - UMR CNRS FRE 3312)

Yann GAVET,

Johan DEBAYLE

JC PINOLI

Imagerie et modélisation des systèmes cellulaires et tissulaires SFR INSERM IFRESIS 143:

Imagerie, Radiologie centrale

Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes

(GIMAP, EA 3064)

Fabien SCHNEIDER

Bruno POZZETTO

www.cytima.org

Secrétariat

Martine FOURNAJOUX tel : 04 77 12 05 12 CHU

Amélie CHATAGNON tel : 04 77 42 01 82 EMSE

labo.auto.immunite@chu-st-etienne.fr

chatagnon@emse.fr

Les Journées stéphanoises de cytométrie rassemblent pour la 13^e année des scientifiques et médecins autour de la problématique d'analyse cellulaire (cytométrie) sous ses différents aspects :

- Analyse de populations cellulaires en suspension (cytométrie en flux) avec des applications en routine pour le diagnostic des hémopathies, troubles plaquétaires, désordres immunologiques
- Analyse des tissus avec diagnostic pathologique des tissus et tumeurs
- Analyse des tissus neurologiques par les techniques récentes d'imagerie
- et leurs applications scientifiques dans le cadre de la recherche scientifique : en hématologie, immunologie et agents pathogènes, neurologie, cancer...
- jusqu'aux aspects techniques d'analyse d'image, reconnaissance de forme, statistiques de populations hétérogènes complexes

Ce congrès régional assemble des scientifiques de toute le quart sud-est de la France.

Il est organisé sous l'égide de trois institutions constituantes de l'institut Fédératif de Recherche Sciences, Ingénierie et Santé de Saint-Etienne (IFRSIS SFR143) : CHU, Faculté de Médecine et Ecole des Mines de Saint-Etienne.

Il peut être organisé grâce à la participation financière des industriels.

Il fait partie de la formation des doctorants dans le domaine et est soutenu par l'école doctorale de Sciences, Ingénierie et Santé de Saint-Etienne (ED-SIS).

AVEC LE SOUTIEN DE :



CYTIMA 2012 / 6 JUIN 2012

09h00-09h15	Accueil et Inscriptions
09h15-09h30	Ouverture
Session: Imagerie et Neurologie (Fabien SCHNEIDER)	
09h30-10h00	Application de la FISH dans les hémopathies malignes Nathalie NADAL (Saint-Etienne) - p.5
10h00-10h30	Atlas IRM 3D de résolution histologique du Thalamus François VASSAL (Saint-Etienne) – p.6
10h30-11h00	<i>Pause</i>
11h00-11h30	Apport du rayonnement synchrotron en imagerie biomédicale Géraldine Leduc (Grenoble) – p.7
Session: Session poster (Yann GAVET)	
11h30-12h30	Présentation orale avec diaporama
12h30-14h00	<i>Repas</i>
Session: Imagerie & Cytométrie (Claude LAMBERT)	
14h00-14h30	Techniques plein champ et confocale, et ultra résolution Yves TOURNEUR (Université Lyon 1) – p.8
14h30-15h00	Image by flowcytometry Jörg SCHLEGEL (Amnis Corporation, UK) - p.9
15h00-15h15	Niche hématopoïétique et Ostéoclaste Anna MANSOUR (Saint-Etienne) – p.10
15h15-15h30	Analyse de frottis cellulaires (DM8) Cristina IOBAGIU (CHR Roanne) – p.11
15h30-16h	<i>Pause</i>
Session: Imagerie et Analyse de Données (Johan DEBAYLE)	
16h00-16h30	Analyse de données de diagnostic du mélanome Bernard FERTIL (LSIS-CNRS Marseille) – p.12
16h30-17h00	Imagerie cellules épithéliales de la Cornée Zhiguo HE (EA2521Saint-Etienne) – p.13
17h00-17h30	Viabilité cellulaire Nora MALLOUK (Saint-Etienne) - p.14

CYTIMA 2012 / 7 JUIN 2012

08h30-08h45	Accueil et Inscriptions
08h45-09h00	Ouverture
Session: Lymphocyte B (Michel PEOC'H, Bruno BRANDO)	
09h00-09h30	Le ganglion : sa physiologie et pathologie Lucile BASEGGIO, Françoise SOLLY (Lyon sud, Saint-Etienne) – p.15
09h30-10h00	De l'hématogone au plasmocyte en 8 couleurs Noémie DELOUCHE (Grenoble) – p.16
10h00-10h30	Lymphocytes B en immunopathologie Claude LAMBERT (Saint-Etienne) Tri magnétique de cellules fonctionnelles Greame MILTON (Stemcell) – p.17
10h30-11h00	<i>Pause</i>
11h00-11h30	Mesure du signal en onco-hématologie Jacques NUMES (Marseille) – p.18
11h30-12h00	Myelogramme par CMF Marie-Christine JACOB (Grenoble) – p.19
12h00-12h30	ZAP 70 methodological problems Bruno BRANDO (Président ESCCA Milano) – p.20
12h30-14h00	<i>Repas</i>
Session: Hématologie (Lydia CAMPOS, Lucile BASEGIO)	
14h00-14h15	Accréditation d'un labo de cytométrie Lauren RIGOLLET (St Etienne) – p.21
14h15-14h30	Accréditation en Europe Ulrich SACK (Leipzig) – p.22
14h30-14h45	Test de Kleihauer Antoine PACHECO (Beckman-Coulter) – p.23
14h45-15h00	Immunocomptage des plaquettes Claire LOOSEN (Belgique) – p.24
15h00-15h15	Analyse des données approche statistique Esther Álvaro Sopena (CliniSciences) – p.25
15h15-15h30	La maladie résiduelle des LAL : Du STIC 5 à 10 couleurs Isabelle ARNOUX (Marseille) – p.26
15h30-16h00	<i>Pause</i>
Session: Immunologie (Jacques BIENVENU)	
16h00-16h30	Déficits immunitaire Ulrich SACK (Leipzig) – p.27
16h30-16h45	IL-7 et restauration lymphocytaire au cours sepsis AP FOREY (Lyon HEH) – p.28
16h45-17h00	Récepteurs TAM au cours du sepsis C. GUIGNANT (Lyon HEH) – p.29
17h00-17h15	Basophiles phénotypes au repos et activation Claude LAMBERT (Saint-Etienne) – p.30

APPLICATION DE LA FISH DANS LES HEMOPATHIES MALIGNES

NATHALIE NADAL, Labo Hématologie, CHU; Saint Etienne, France

Les cancers, et en particulier les hémopathies malignes, sont des maladies génétiquement acquises. Leur pronostic dépend des gènes impliqués. La cytogénétique des hémopathies malignes consiste en la recherche d'anomalies chromosomiques acquises survenues lors d'un processus tumoral. Ces anomalies n'existent que dans les cellules tumorales. Elles peuvent être :

- Primaires, liées à une transformation tumorale. Elles sont spécifiques d'un type tumoral mais pas forcément seules responsables de la malignité.
- Secondaires, non spécifiques, liées à l'évolution clonale. Elles se surajoutent aux anomalies primaires. Elles, non plus, ne surviennent pas au hasard suggérant l'existence de séquences prédéterminées.

L'intérêt de l'analyse cytogénétique dans le cadre des hémopathies malignes tient (1) dans son rôle dans l'établissement du diagnostic (2) à la valeur prédictive des anomalies qui permet d'évaluer le pronostic et (3) le résultat de l'analyse cytogénétique oriente la décision thérapeutique.

La cytogénétique conventionnelle (caryotype) est l'examen de première intention. Elle permet, en un seul examen, la mise en évidence de toutes les anomalies chromosomiques présentes dans une même cellule. Cependant des limites liées au niveau de résolution ont amené au développement de la cytogénétique moléculaire reposant sur l'hybridation in situ en fluorescence (FISH). L'introduction de cette technique a considérablement élargi le champ d'application de la cytogénétique. Alors que la cytogénétique conventionnelle est une analyse pangénomique, la FISH ne permet de d'analyser que les anomalies détectables par la sonde génomique utilisée. Analyse ciblée, elle reste un examen de deuxième intention, complémentaire au caryotype.

Lors d'une analyse cytogénétique, deux situations principales se présentent. Soit le caryotype est informatif et il n'y a pas d'indication de FISH. Soit le caryotype est partiellement ou non informatif, l'indication d'une analyse FISH est alors discutée en fonction des données clinico-biologiques et du caryotype lui-même. Pour chaque pathologie, la décision est fondée sur un certain nombre de critères :

- La fréquence de l'anomalie recherchée,
- L'existence de formes cryptiques indétectables par cytogénétique conventionnelle,
- L'impact décisionnel de l'anomalie et donc l'urgence de la réponse,
- La difficulté technique et le coût de l'analyse.

La caractérisation biologique des hémopathies malignes nécessite une approche complémentaire comprenant la morphologie, l'histologie, l'immunophénotypage la cytogénétique conventionnelle et moléculaire et la biologie moléculaire. Au cours de cette présentation nous verrons les aspects techniques de FISH et les principales applications en l'oncohématologie.

ETUDE ANATOMIQUE DU THALAMUS HUMAIN EN IRM A 4,7- TESLA: PROPOSITION D'UN ATLAS NUMERIQUE 3D DE RESOLUTION HISTOLOGIQUE ET APPORT POUR LA CHIRURGIE STEREOTAXIQUE

FRANÇOIS VASSAL, Service de Neurochirurgie, CHU de Saint-Etienne, France et Equipe de Recherche, EA IGCNC, UMR 6284 ISIT, Université de Clermont-Ferrand 1, UFR Médecine, Hôpital Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France

JEAN-JACQUES LEMAIRE, Service de Neurochirurgie A, CHU de Clermont-Ferrand, Hôpital Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand, France

INTRODUCTION

Les atlas stéréotaxiques ne permettent qu'une compréhension partielle de l'architecture tridimensionnelle (3D) du thalamus puisqu'ils sont issus de coupes histologiques sériées, réalisées dans les 3 plans (axial, coronal, sagittal), chacun d'eux nécessitant par définition un spécimen anatomique distinct (problème d'extrapolation 3D). Nous avons réalisé une étude anatomique du thalamus humain en IRM à 4,7-Tesla pour revisiter sa systématisation/segmentation interne et proposer un atlas numérique 3D de définition histo-architecturale, directement disponible pour les Neurosciences Cliniques.

MATERIEL-METHODE

Deux cent cinquante-six coupes d'un spécimen anatomique, centrées sur les ganglions de la base, ont servies pour l'étude morphologique (voxel= 0,253 mm³). La segmentation des noyaux intrathalamiques a été réalisée manuellement (logiciel iPlan Stereotaxy, BrainLab, Allemagne) sur la base de contrastes IRM spontanés et de la position relative des différentes structures. Les connaissances issus d'atlas stéréotaxiques (Talairach & Tournoux, Schaltenbrand & Bailey, Morel & Magnin) et de livres d'anatomie ont servies à l'identification primaire des différents noyaux, qui a été finalisée grâce au suivi 3D.

RESULTATS

L'ensemble des groupes nucléaires intra-thalamiques a pu être segmenté: antérieur, ventro-latéral, laminaire, médian, intermédiaire, dorsal, postérieur, et superficiel. Les structures annexes ont également été parfaitement précisées: méta-thalamus (habénula), épithalamus (corps genouillés), faisceau mamillothalamique, zona incerta, champs de Forel. L'information 3D infra-millimétrique a permis une meilleure compréhension de la segmentation 3D intra-thalamique, directement exploitable en clinique pour l'identification et la visée directe des principales cibles stéréotaxiques (noyau ventrointermédiaire notamment), car les contrastes sont identiques en IRM à 1,5-Tesla.

CONCLUSION

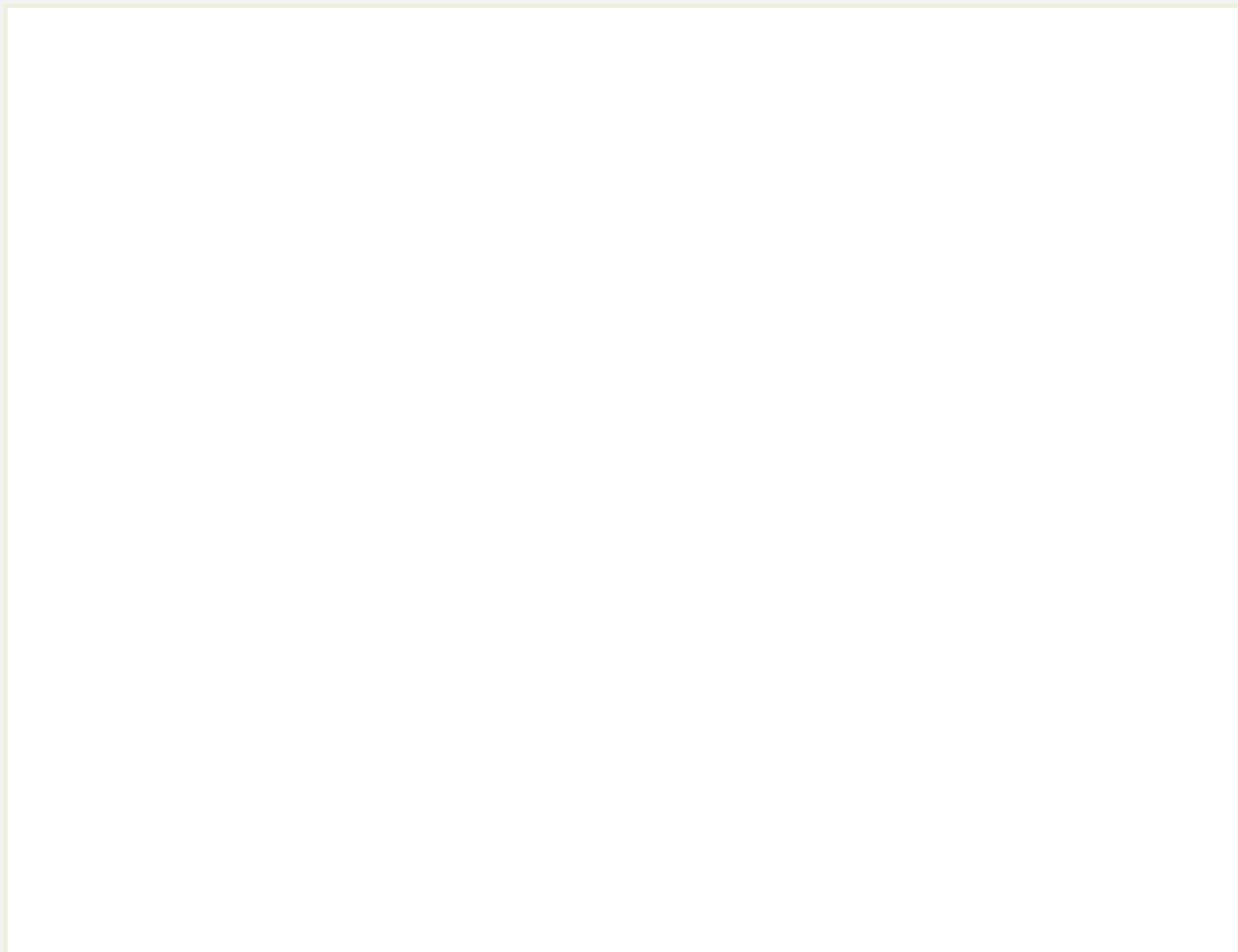
Ce travail a permis de revisiter l'anatomie complexe du thalamus. Les applications cliniques directes sont discutées.

BIBLIOGRAPHIE

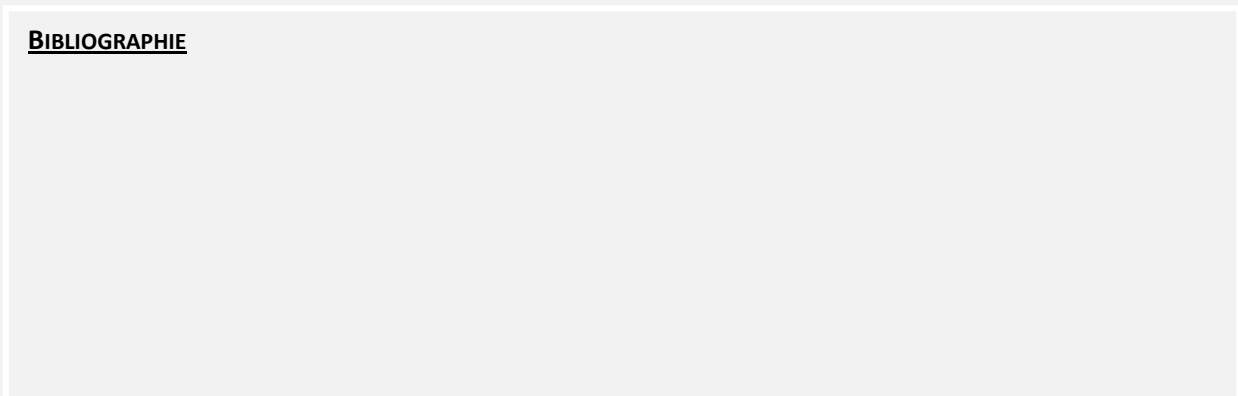
F.Vassal et al. Brain Stimul. Direct stereotactic targeting of the ventrointermediate nucleus of the thalamus based on anatomic 1.5-T MRI mapping with a white matter attenuated inversion recovery (WAIR) sequence, 2012 Feb 22 [Epub ahead of print].

APPORT DU RAYONNEMENT SYNCHROTRON EN IMAGERIE BIOMEDICALE

GERALDINE LEDUC



BIBLIOGRAPHIE



MICROSCOPIE OPTIQUE NOUVELLES TECHNIQUES

YVES TOURNEUR, Centre de Quantimétrie, Université Claude Bernard, 69360, France

INTRODUCTION

Optical microscopy knows a revival. New technologies overcome what appeared to be the limit of optics and now makes images at the nanoscale.

CLASSICAL AND CONFOCAL MICROSCOPES

The compound microscope is composed of a short focal lens as objective, and a longer focal lens as ocular. The development of fluorescence microscopy provided valuable tools for biologists. The drawback of this system is that it overlays the sharp image of all focused planes and the blurred image of off-focus regions. Confocal microscopes eliminate light from off-focus planes and permits sharp images from one slice of the preparation. Successive images can form 3 dimensions objects. The advent of biphotons microscopy allows investigation of deeper tissue.

ULTRA-RESOLUTION TECHNIQUES

The classical theoretical limit of optical imaging, including confocal, is ~200 nm horizontal and ~600 nm in depth. Evanescent wave and two objectives microscopy decrease the vertical resolution down to 100 nm. Heterodyne techniques (holography and structured illumination) permits to double the horizontal resolution. Doughnuts light (STED, GSD) and pointillist techniques (PALM, STORM) brings resolution or precision to few tens of nanometers.

CONCLUSION

A large variety of new techniques now brings optical microscopy close to the domain of electron microscopy, but eventually on living cells.

BIBLIOGRAPHIE

M.G. Gustafsson, *Extended resolution fluorescence microscopy. Curr Opin Struct Biol.* 1999 9:627-34.

Schermelleh, L., Heintzmann, R., Leonhardt, H. *A guide to super-resolution fluorescence microscopy. J. Cell Biol.* 2010 190:165-175

T.J. Gould, S.T. Hess, J. Bewersdorf. *Optical nanoscopy: from acquisition to analysis. Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2012. 14:231-54

T.J. Gould, S.T. Hess. *Nanoscale biological fluorescence imaging: breaking the diffraction barrier. Meth Cell Biol.* 89: 329-358

IMAGING FLOW CYTOMETRY

JÖRG SCHLEGEL, Merck Millipore, Millipore Bioscience Division, Millipore AG, Dammstrasse 19, CH-6301 ZUG, Switzerland

The Image-Stream-X from Amnis (Merck Millipore) performs high speed high resolution multispectral imaging in flow. Up to 12 simultaneous fluorescent, brightfield and darkfield images can be generated from every cell at speeds up to 1000 cells/sec thereby broadening the applications of traditional imaging techniques to include the quantitative analysis of rare cells in primary samples.

Data analysis with IDEAS software allows the use of more than 80 features and 16 image masking algorithms as well the creation of own masks and features using a Boolean logic.

The benefits of this technology include (i) the ability to identify and objectively quantify events happening on, within, or between cells, (ii) the elimination of false positive and false negative events and (iii) the evaluation and quantification of morphological changes in cells.

Typical applications for this new technology are morphological studies/shape change, internalization, localization/co-localization, cell death/apoptosis/autophagy, cell cycle and mitosis, cell-cell interactions, DNA damage and repair, Stem Cell differentiation, targeted immunotherapy, microbiology, parasitology, oceanography, etc.

OSTEOCLASTS CONTROL THE ESTABLISHMENT OF HEMATOPOIETIC STEM CELL NICHE IN THE BONE MARROW

ANNA MANSOUR, CNRS LP2M, Nice, France and HSC Laboratory, Lund Research Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy, Lund, Sweden

GRAZIA ABOU-EZZI, ABDELILAH WAKKACH, CLAUDINE BLIN-WAKKACH, CNRS LP2M, Nice, France

EWA SITNICKA, HSC Laboratory, Lund Research Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy, Lund, Sweden

STEN EIRIK JACOBSEN, HSC Laboratory, Lund Research Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy, Lund, Sweden and HSC Laboratory, Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK

Bone marrow (BM) is the major site for hematopoiesis in adults and its colonization by hematopoietic stem cells (HSCs) requires osteoblast (OBL) function, endochondral ossification and invasion by blood vessels. HSC niches in the BM are located in the trabecular regions of the bone (endosteal niches composed by OBLs) or in vascular area (perivascular niche composed by perivascular mesenchymal progenitors). These niches provide factors that control the cell fate. However, despite the strong interaction and coupling activity that exists between OBLs, mesenchymal cells and the bone-resorbing osteoclasts (OCLs), little is known about the relative contribution of OCLs in these niches. Our aim was to determine if OCLs play a role in the establishment of the HSC niche, using a murine model displaying inactive OCLs with a mutation specific of OCL activity, the *oc/oc* mouse.

We show that absence of OCL activity results in a defective HSC niche leading to a dramatic reduction of Lin-Sca1+c-kit+ (LSK) hematopoietic progenitor/stem cells in the BM of *oc/oc* mice.

In the *oc/oc* BM, mesenchymal progenitor cells including the perivascular ones are accumulated to the detriment of OBLs, but they fail to attract HSCs *in vitro* and *in vivo*. They also have a reduced expression of the chemokines, cytokines and growth factors involved in the niche function compared to *+/+* controls. Furthermore, the interactions between OCLs and pre-OBLs are disrupted in the *oc/oc* BM.

The role of OCLs in the HSC niche formation was confirmed by restoring activity by *in vivo* transfer of either *+/+* LSK cells or dendritic cells known to efficiently differentiate into OCLs *in vivo*. This restoration rescues OBL differentiation, the interactions between OCLs and pre-OBLs, the defect in HSC niche formation and HSC homing.

Our results demonstrate for the first time that OCL activity is necessary for the establishment of the HSC niche in the BM. This function of OCL is not limited to carving space for niches in the bone but they can also regulate the HSC-supportive function of mesenchymal cells and their differentiation to the OBL lineage. These findings broaden our knowledge of the HSC niche formation that is critical for understanding normal and pathological hematopoiesis.

BIBLIOGRAPHIE

Mansour and al, Exp Med. 2012 Mar 12;209(3):537-49. Epub 2012 Feb 20.

ANALYSE AUTOMATIQUE DES FROTTIS CELLULAIRES

IOBAGIU C, NEHAR D, DENIS I, BOYER M, HERBIN E, Laboratoire d'Hématologie, CH Roanne, France

L'examen morphologique des frottis sanguins reste l'examen de première intention qui permet de sélectionner les cas nécessitant une analyse cellulaire complémentaire pour argumenter un diagnostic hématologique. Cependant, cette analyse, manuelle, est très consommatrice de temps.

Les microscopes motorisés couplés à un logiciel d'analyse d'images, tel que le système CellaVision® DM8, sont capables de réaliser une reconnaissance et une pré-classification des cellules du frottis sanguin en 18 catégories ; les images enregistrées sont validées à l'écran par le cytologiste.

Dans cette étude, nous montrons que les performances de la lecture automatique sont comparables à celles de la lecture traditionnelle au microscope et aux résultats rendus par l'automate de numération (XE5000 Sysmex®).

L'analyse des alarmes sur la numération cellulaire rendue par l'automate XE5000 (quantitatives - hyperlymphocytoses ou qualitatives - lymphocytes atypiques, granulocytes immatures, blastes, scattergramme anormal, distribution plaquettaire anormale, agglutination plaquettaire, hématies anormales, hématies parasitées, parasites) montrent une très bonne performance du lecteur automatique DM8, avec identification de toutes les anomalies qualitatives révélées par lecture classique du frottis :

- dysplasie granulocytaire : hypo/dégranulation, anomalies de segmentation (concordance parfaite lecture microscope classique – microscope automatisé)
- dysplasie érythrocytaire : présence d'érythroblastes, anomalies de taille ou de contenu en hémoglobine
- bonne reconnaissance cellulaire par le système DM8 (blastes, plasmocytes, érythroblastes, plaquettes géantes)
- affichage des hématies parasitées, cellules rares (plasmocytes, blastes, basophiles)

Les formules rendues par les deux modalités de lecture microscopique sont superposables, à l'exception du pourcentage des monocytes qui est inférieur en lecture automatique dans 88% de cas, différence sans conséquence clinique. Le diagnostic est aisé sur les images présentées à l'écran : reconnaissance facile de l'aspect monotypique des lymphocytes monoclonaux, l'aspect polymorphe des lymphocytes lors des stimulations immunitaires.

La rapidité d'analyse du frottis en lecture automatique est évidente par rapport au microscope traditionnel, surtout pour les frottis issus d'échantillons avec leucopénies ; des séries de 8 lames sont chargées. Le système DM8 apporte des avantages pour le laboratoire, par une connexion bidirectionnelle (identités sécurisées), traçabilité et archivage des images, outil d'enseignement et formation en cytologie, maintenance très facile. Cet outil a les performances nécessaires au fonctionnement du laboratoire d'hématologie de dimensions moyennes.

ANALYSE DE DONNÉES POUR LE DIAGNOSTIC DU MÉLANOME

BERNARD FERTIL, Laboratoire des Sciences de l'Information et des Systèmes (LSIS), UMR CNRS 7296 - Equipe I&M, Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy (ESIL), case 925 - 163, avenue de Luminy - 13288 Marseille cedex 9, France

Le diagnostic du mélanome s'effectue classiquement par l'examen visuel des grains de beauté. Le dermatologue recherche certains signes de malignité comme la multiplicité de couleurs, la présence de structures particulières, l'asymétrie, ... , souvent avec l'aide d'un dermoscope (loupe munie d'un éclairage annulaire). Il combine ensuite ces signes pour produire un diagnostic et prendre une décision thérapeutique.

Dans cette présentation, je décrirai les étapes requises pour la construction d'un classifieur automatique des grains de beauté et présenterai le protocole de validation et d'évaluation d'un tel système. Je comparerai notamment une approche fondée sur la reconnaissance des signes de malignité, -à l'image de ce qui est formalisé par les dermatologues-, à une approche beaucoup moins spécifique qui exploite un ensemble de descripteurs polyvalents d'images quelconques. Je montrerai ensuite comment le classifieur automatique peut contribuer à améliorer la décision du dermatologue, par fusion tardive ou précoce des deux « expertises ».

BIBLIOGRAPHIE

R. Jorh, "Dermoscopy: alternative melanocytic algorithms—the ABCD rule of dermoscopy, menzies scoring method, and 7-point checklist," Clinics in dermatology, 2002.

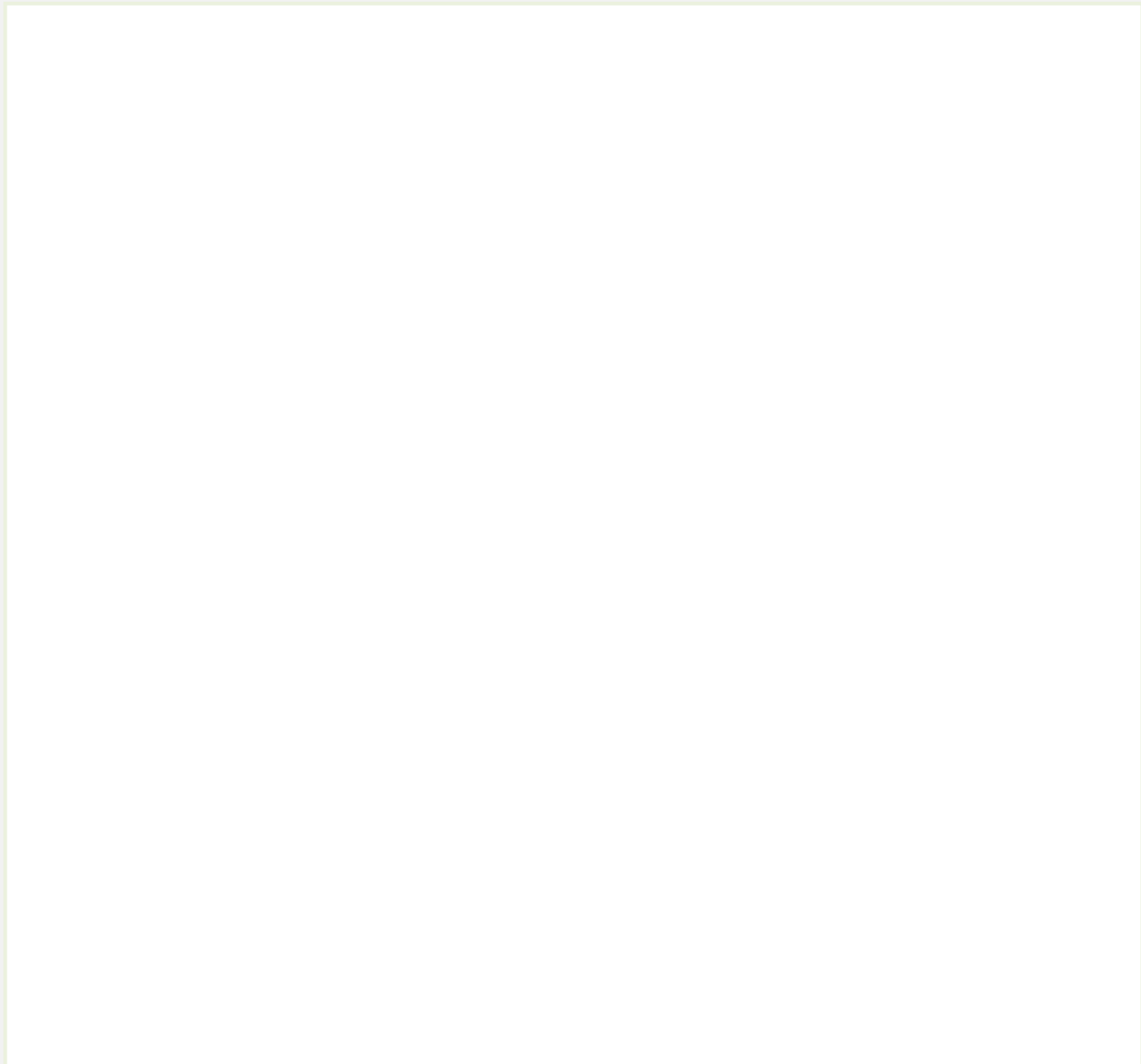
A. Tenenhaus, A. Nkengne, J.-F. Horn, C. Serruys, A. Giron, and B. Fertil, "Detection of melanoma from dermoscopic images of naevi acquired under uncontrolled conditions.," Skin research and technology, vol. 16, no. 1, pp. 85-97, 2010.

M. Heikkil, "Description of Interest Regions with Center-Symmetric Local Binary Patterns," Image (Rochester, N.Y.), vol. 2, pp. 58-69, 2006.

M. Zortea, S. O. Skrovseth, and F. Godtliebsen, "Automatic learning of spatial patterns for diagnosis of skin lesions.," Conference Proceedings of the International Conference of IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, vol. 2010, pp. 5601-5604, 2010.

IMAGERIE CELLULES EPITHELIALES DE LA CORNEE

Zhiguo HE (EA2521Saint-Etienne)



BIBLIOGRAPHIE

STABILITE DES ECHANTILLONS APRES PRELEVEMENT MESURE PAR UN NOUVEAU CYTOMETRE EN IMAGE CHEMOMOTEC NC 3000

NORA MALLOUK, FREDERIC GRU, CLAUDE.LAMBERT, GRT PAR EA3065 univ J Monnet Saint-Etienne, Labo Immunologie, CHU et Ecole Nationale Supérieure des Mines, UMR-CNRS FRE 3312, LPMG; SFR 143 INSERM IFRESIS ; Saint Etienne, France

INTRODUCTION

La qualité de l'échantillon est primordiale pour les études cytométriques: phénotypiques et encore plus fonctionnelles. Le stade pré-analytique n'est cependant pas toujours maîtrisé et il existe peu d'études sur les méthodes optimales de conservation. La viabilité cellulaire peut être analysée avec précision par cytométrie. A l'occasion de l'évaluation d'un nouveau cytomètre en image miniaturisé, nous avons analysé l'évolution de la viabilité cellulaire en différents milieux de prélèvement et modes de conservation.

METHODE

Les prélèvements ont été effectués chez des volontaires sains ou des patients dans le cadre de diagnostic. Les prélèvements étaient pratiqués sur EDTA ou Héparinate de lithium et conservés à température de la pièce ou au frigo pour 1 à 72 heures. Les analyses ont été faites sur sang total, par dapi/ iodure de propidium avec NC3000 de CHEMOMETEC, Sartorius (Danemark) selon les recommandations du fournisseur ou par comptage par cytométrie en flux 6 couleurs (BD FACSCANTO II et DIVA 6.0) selon la méthode de routine décrite précédemment.

RESULTATS

Nos résultats montrent la facilité et la fiabilité des mesures par le cytomètre NC3000. L'analyse répétée montre une bonne répétabilité pour le compte cellulaire (CV 4.6%) aussi bien que la viabilité (CV = 3.34%) sur 8 réplicats et reproduit chez plusieurs donneurs. La taille globale des PMBC est également mesurée dans l'analyse (11.36 μ L +029 (CV 2.57%). Les comptes cellulaires sont directement corrélés ($r^2 = 0.793$; n=52) au compte de leucocytes sur le marquage CD45/SSC au cytomètre en flux. On observe une bonne reproductibilité sur 4 semaines et une bonne justesse en analysant un contrôle de qualité externe. Le comptage est très linéaire de 200 à plus de 6500 cellules / μ l.

Les 2 types de prélèvements sur EDTA ou héparine, conservés à température ambiante ou au réfrigérateur ne montrent pas de baisse significative du compte de cellules dans les 72 heures. Par contre, la viabilité cellulaire, mesurée sur la perméabilité à l'iodure de propidium est plus faible et décroît nettement dans les prélèvements sur EDTA (de 45% à 25% et plus nettement encore dans l'échantillon gardé à 4°C (comprenant de nombreux chocs thermiques pour les dosages répétés) alors qu'elle est restée stable pour les prélèvements sur héparine (de 60 et 70%).

CONCLUSION

Importance du type d'échantillon, l'EDTA qui est classiquement recommandé n'est pas le meilleur mode de conservation. Des analyses plus fines sont en cours puisque le système permet d'analyse l'apoptose, le cycle cellulaire et la vitalité cellulaire. De plus, les cellules peuvent être marquées avec 3 couleurs disponibles.

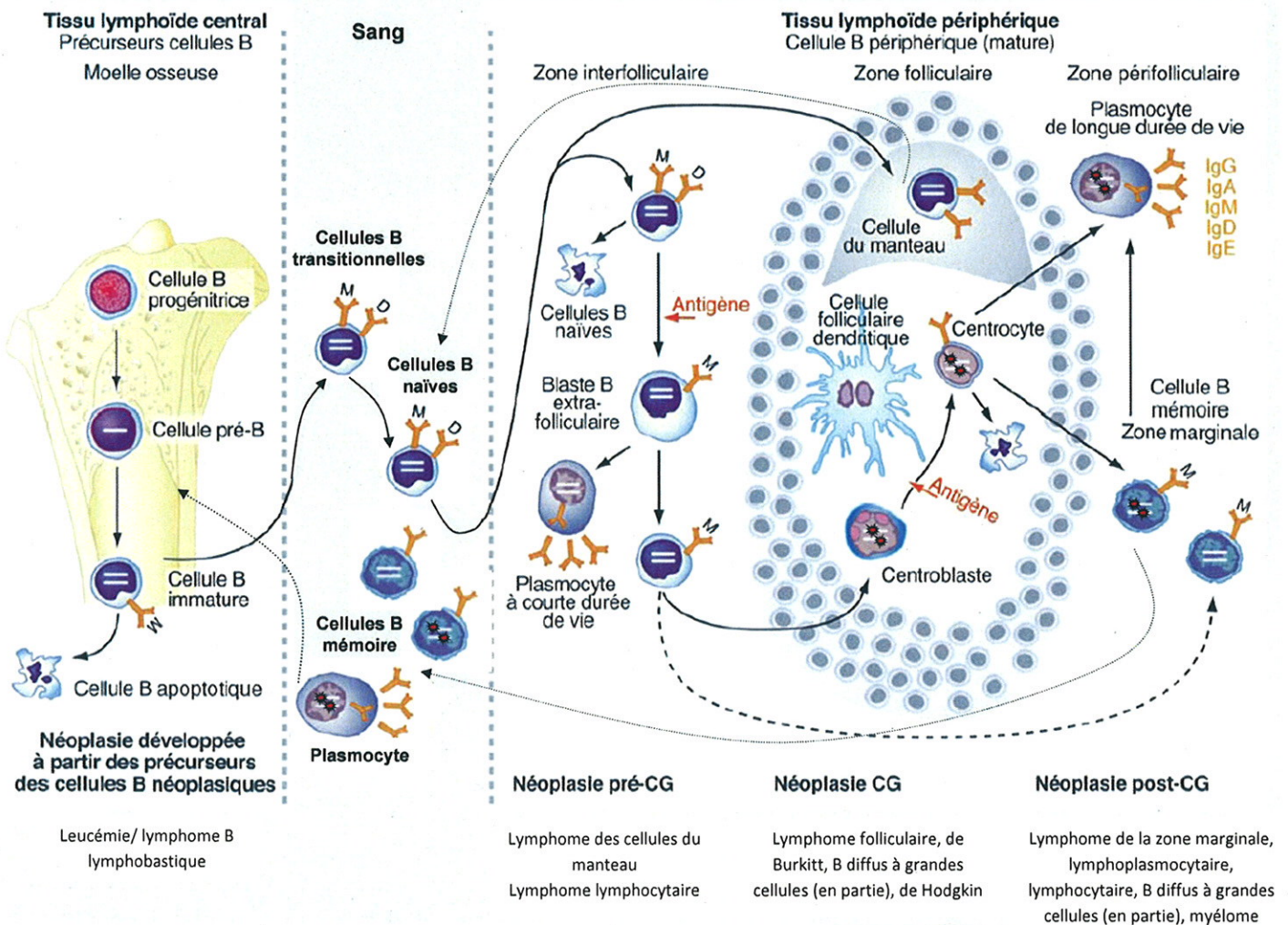
Le ganglion : rôle dans la physiologie et la pathogénèse des hémopathies lymphoïdes matures.

Lucile Baseggio – Laboratoire d'hématologie – CHU de Lyon Sud

Françoise Solly – Laboratoire d'hématologie – CHU de Saint-Etienne

Les lymphomes sont des cancers se développant à partir de cellules lymphoïdes matures. La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS), faisant suite à la classification REAL et guidant les choix thérapeutiques, est basée sur la notion d'entités définies à partir de données cliniques, de critères morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires découlant en partie de travaux sur la différenciation des cellules B et T normales. En effet, à la suite d'un blocage, chacune des cellules jalonnant la différenciation des lymphocytes B et T peut donner naissance à un lymphome qui conserve la majorité des attributs immunologiques, morphologiques et géniques des cellules normales dont il dérive.

Cette présentation revoie les principales étapes de la différenciation des cellules B au sein du ganglion, pour une meilleure compréhension de la pathogénèse, de la classification et des outils du diagnostic des hémopathies lymphoïdes matures. Les lymphomes pour lesquels une ressemblance à l'équivalent normal constitue un élément de classification seront détaillés.



Adapté de Jaffe E et al Blood 2008 et Russano de Paiva et al EMC 2009

Représentation schématique de la différenciation lymphoïde B et ses relations avec les principales néoplasies à cellules B.

DE L'HEMATOGONE AU PLASMOCYTE : TOUTE LA DIFFERENCIATION B EN 8 COULEURS

N.DELOUCHE^{1,2}, C.VETTER¹, MC. JACOB²

¹Laboratoire d'Hématologie Cellulaire, ²Laboratoire d'Immunologie - Institut de Biologie et Pathologie du CHU de Grenoble, Boulevard de la Chantourne 38700 La Tronche, FRANCE

L'immunophénotypage par cytométrie en flux multiparamétrique est un outil de choix dans l'exploration du phénotype complexe des populations cellulaires.

L'objectif de cette étude est d'identifier et d'établir le profil phénotypique des populations B depuis les précurseurs médullaires ou hématogones jusqu'aux lymphocytes B mémoires et plasmocytes.

Sur la base des données d'immunophénotypage issues de la littérature, nous avons développé une nouvelle combinaison d'anticorps en cytométrie de flux 8 couleurs permettant de dénombrer jusqu'à 10 populations cellulaires B au sein de prélèvements biologiques de nature très différente (sang périphérique, sang de cordon, moelle osseuse et ganglion).

FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
IgM	IgD	CD38	CD27	CD10	CD19	CD5	CD45
CD44	CD24	CD38	CD27	CD10	CD19	CD5	CD45
CD81	CD22	CD38	CD27	CD10	CD19	CD5	CD45
CD20	CD23	CD38	CD27	CD10	CD19	CD5	CD45
CD43	CD21	CD38	CD27	CD10	CD19	CD5	CD45
CD86	BAFF-R	CD38	CD27	CD10	CD19	CD5	CD45
X	CD40	CD38	CD27	CD10	CD19	CD5	CD45

L'originalité de cette étude repose également sur la proposition d'un schéma de la différenciation lymphoïde B, basé sur l'expression quantitative d'une série de 17 antigènes impliqués dans la maturation ou la fonction de ces cellules.

BIBLIOGRAPHIE

van Lochem, E.G., et al., Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*, 2004. **60**(1): p. 1-13.

McKenna, R.W., et al., Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leuk Lymphoma*, 2004. **45**(2): p. 277-85.

Ha, Y.J., et al., Characterization of phenotypically distinct B-cell subsets and receptor-stimulated mitogen-activated protein kinase activation in human cord blood B cells. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(6): p. 1557-64.

Perez-Andres, M., et al., Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010. **78 Suppl 1**: p. S47-60.

Bohnhorst, J.O., et al., Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol*, 2001. **167**(7): p. 3610-8

Isolation des Cellules Immunitaires Fonctionnelles

Graeme Milton, STEMCELL Technologies S.A.R.L., 40 Rue des Berges, Miniparc Polytec, 38000 Grenoble, France

INTRODUCTION

STEMCELL Technologies provides high quality, standardised cell isolation products for the quick and easy purification of immune cells from various species.

CELL ISOLATION

EasySep™ isolates cells by either negative or positive selection using flow cytometry-compatible magnetic particles. The system is both flexible and scalable, making it amenable to various different applications. A fully automated system, called RoboSep™, also exists.

RosetteSep™ provides one-step, density-based negative selection directly from whole blood or buffy coat. RosetteSep™ crosslinks unwated cells to red blood cells present in the sample to form immunorosettes that subsequently pellet during a standard density centrifugation.

CONCLUSION

EasySep™ and RosetteSep™ are quick and convenient methods that may be used to isolate immune cell populations; they can be used as stand-alone purification methods or as pre-enrichment steps to reduce the time required for FACS.

BIBLIOGRAPHIE

Selected publications using STEMCELL Technologies' products are available online at www.STEMCELL.com or by contacting Technical Support at techsupport@STEMCELL.com



SIGNALING MONITORING IN LEUKEMIC PATIENTS

JACQUES A. NUMÈS, et col....

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM U1068, CNRS UMR7258, Aix-Marseille Université, Institut Paoli Calmettes, 13273 MARSEILLE cedex 09, France

A technology that allow us to track the cell signaling alterations at the individual cell level, represents a terrific advance to determine phenotypes of individual cancer cells. Using intracellular flow cytometry, it is now possible to do it (Irish JM et al. Cell 2004).

Our first goal has been to validate this technology « in situ » using commercially available antibodies against the activated forms of the PI3K effector, the serine/threonine kinase, Akt in normal cells such as primary human T lymphocytes (activated or not with CD3 plus CD28 antibodies).

Then we improved this method to apply this detection of cell signaling events to primary cancer cells (Firaguay G and Nunès J.A. Science Signaling 2009). We are currently identifying cell signaling signatures in acute myeloid leukaemia patients.

BIBLIOGRAPHIE

Firaguay, G., and J. A. Numès. Analysis of signaling events by dynamic phosphoflow cytometry. 2009. *Sci Signal* 2:p13.

J. A. Numès, Firaguay, G., and E. Coppin. Analysis of cellular signaling events by flow cytometry. 2012. *Flow Cytometry / Book 1*, ISBN 979-953-307-355-1.

MYELOGRAMME PAR CMF EN 1 TUBE DE 8 COULEURS

FRANÇOISE SOLLY. Laboratoire d'hématologie - CHU de Saint-Etienne - 42270 Saint-Priest en Jarez, France

MARIE-CHRISTINE JACOB. Laboratoire d'immunologie - CHU de Grenoble - 38701 La Tronche, France

La moelle osseuse est le siège de la différenciation précoce de l'ensemble des cellules hématopoïétiques, sauf celle des lymphocytes T, et de la différenciation terminale des plasmocytes. Son étude en cytologie apporte indiscutablement des renseignements essentiels pour le diagnostic et le suivi des hémopathies. L'étude immunologique par cytométrie en flux (CMF) vient compléter les investigations lorsqu'un envahissement tumoral est suspecté.

Notre objectif actuel est de proposer un tube de screening en 8 couleurs, permettant de dénombrer les principales populations myéloïdes et lymphoïdes et de détecter des anomalies quantitatives et/ou qualitatives de ces cellules. Cette étude est menée en collaboration entre Grenoble et Saint-Etienne avec une démarche de standardisation de l'analyse inter-centres.

Actuellement, nous avons validé un panel de 8 anticorps et nous proposons une méthodologie de fenêtrages successifs pour identifier les populations d'intérêt. Nous montrons ainsi la faisabilité de cette approche pour l'identification de très nombreuses cellules normales ou pathologiques présentes dans les prélèvements de moelles osseuses.

POSITIVE OR NEGATIVE? THAT IS THE QUESTION!

BRUNO BRANDO, Hematology Laboratory and Transfusion Center, Legnano Hospital, 20025 Milano, Italy.

The cytometrical definition of a positively or negatively stained cell population by (immuno)fluorescence techniques is an issue of utmost importance in the diagnostic assessment of haematological malignancies. Interestingly, the technical criteria for a clearcut and standardized definition of what is 'positive' and what is 'negative' have not been addressed in sufficient detail in the flow cytometric literature.

As a consequence, an objective technique like flow cytometric analysis of fluorescence may fall in the realm of subjective interpretation, and the actual diagnostic role of some critical but weakly expressed cell markers can remain controversial (as an example ZAP70).

The analysis and interpretation of fluorescence distribution diagrams was developed with lymphocyte subset studies in the early '80s. Since lymphocyte subpopulations defined by surface monoclonal antibodies usually yield clearcut and well separated fluorescence distribution clusters (i.e. "discrete" or "heterogeneous" distributions), the setting of cutoff limits, quadrants or windows, has been conventionally the most natural way to dissect cell subsets and to calculate their respective percentage over the whole lymphocyte population.

Unfortunately, such an approach was also applied to the rising flow cytometric analysis of haematological malignancies, where homogeneous leukemic cell populations usually stain massively but weakly. A strong 'percent positive' mental imprinting was established among many laboratory haematologists worldwide and it is still present in authoritative guidelines (Ref. n1). This technically inappropriate usance, although just reported as 'customary' in the literature, is to be applied by certified laboratories both in their routine and in External Quality Assessment (EQA) exercises like UKNEQAS Leukaemia Immunophenotyping. The conceptual error resides in the attempt to dissect homogeneous fluorescence distributions with a cutoff marker in order to calculate a putative percentage of 'positively' brightly stained cells. Another deeply stuck error is to use an arbitrarily established 'percentage of positive' cell value (i.e. 20% or 30%) to assess whether the entire abnormal cell population can be deemed as positive or negative for a given leukemic marker.

The appropriate technical approach to the interpretation of weakly stained haematolymphoid neoplastic cells is however quite different from that used in non-oncological lymphocyte subsetting.

Statistical homogeneity is likely to imply biological homogeneity. This concept is widely applied in other diagnostic assessments of malignant blood diseases, such as immunohistochemistry, cytogenetics or molecular analysis. For example, the cell marker expression in a lymph node slide and the demonstration of a translocation or of a gene mutation are simply reported in a qualitative fashion as 'present' or 'absent' with no reference to any cell percentage.

In this lecture a critical review of the technical and statistical approaches used to define as 'positive' or 'negative' a weakly fluorescent leukaemic cell population will be presented, with emphasis on new evidences concerning the intrinsic variability of sample replicates (Ref. n2).

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Bain BJ. et al. *Clin Lab Haem* 2002; 24: 1-13.
- 2) Lampariello F. *Cytometry* 2009; 75A: 665-674

ACCREDITATION : VALIDATION DES METHODES POUR LA CMF EN ONCO-HEMATOLOGIE

LAUREN RIGOLLET, Laboratoire d'Hématologie, CHU St Etienne, av. Albert Raimond, 42270 St-Priest-en-Jarez, France

La réforme de la biologie médicale impose, entre autres, l'accréditation des laboratoires à l'horizon 2016. Cette démarche concerne l'ensemble des étapes de l'examen de biologie médicale, du prélèvement à la transmission du résultat. La partie analytique de l'examen de biologie médicale, en particulier, doit être conforme à certains critères définis par le COFRAC et la preuve en sera apportée par la constitution du dossier de vérification (portée A) ou de validation (portée B) des méthodes.

Nous nous sommes intéressés ici à cette partie « analytique » du dossier d'accréditation, pour la paillasse de cytométrie en flux dans le cadre du diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs. L'application « à la lettre » des recommandations du guide SH GTA 04 du COFRAC est quasiment impossible dans le domaine de la CMF. Nous avons donc débuté la validation des méthodes à la paillasse de CMF avec notre propre interprétation (bien sûr discutable !) du guide SH GTA 04, en nous plaçant dans le cadre d'une portée B. La question du caractère qualitatif ou quantitatif de la CMF reste posée. Nous présenterons les résultats des tests que nous avons d'ores et déjà réalisés en vue de la constitution du dossier de validation des méthodes.

Au-delà des éléments strictement techniques, la validation et l'accréditation de la CMF pose de nombreuses questions d'interprétation des critères du COFRAC, et la discussion reste ouverte : le diagnostic des hémopathies malignes est-il une méthode qualitative ou quantitative ? Jusqu'où aller dans la validation technique ? Le coût de cette démarche, en réactifs mais aussi en temps personnel, devra également être évalué....

BIBLIOGRAPHIE

Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale : SH GTA 04 (COFRAC)

ACCREDITATION IN EUROPE

ULRICH SACK, GULDEREN YANIKKAYA DEMIREL, CHANTAL FOSSAT, NIKOLITSA KAFASI, KATHERINA PSARRA, CLAUDE LAMBERT, Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Institut für Klinische Immunologie, Johannisallee 30, 04103 Leipzig GERMANY

By growing implementation of ISO 15189 based standardization in European laboratory diagnostics, flow cytometric labs are more and more challenged to introduce compliant quality management systems.

Although in most countries accreditation of such laboratories is not yet compulsory, proof of following these rules is widely requested.

In contrast, implementation of such a system is considered to be very hard for clinical cytometry. Therefore, European Society of Clinical Cell Analysis (ESCCA) analyzed consequences of accreditation process for cytometric labs and investigated flow cytometrists' attitudes and misgivings according these requirements.

As major challenges, staff qualification, adaptation of multicolor antibody panels, and quality assessment has been identified.

BIBLIOGRAPHIE

ISO (2007) 15189-2003 Medical Laboratories — particular requirements for quality and competence, ISO, Geneva.

Jean-Claude Libeer: Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. Clinical Biochemistry 42 (2001) 173-177.

Gulderen Yanikkaya-Demirel. ISO 15189 accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory II. Clinical Biochemistry 42 (2009) 279–283.

TEST DE KLEIHAUER

ANTOINE PACHECO, Beckman-Coulter



BIBLIOGRAPHIE

IMMUNOCOMPTAGE DES PLAQUETTES : POURQUOI ET COMMENT ?

CLAIRE LOOSEN, BERNARD CHATELAIN, Centre Hospitalier Universitaire de Mont-Godinne, Laboratoire d'hématologie, Avenue Dr Thérasse, 15530 YVOIR, Belgique

La numération plaquettaire est un paramètre important tant dans les laboratoires d'hématologie pour l'évaluation du risque hémorragique et du besoin transfusionnel que dans les établissements de transfusion pour la préparation de concentrés plaquettaires.

L'immunocomptage plaquettaire par cytométrie en flux en méthode double plateforme a été validé par l'ISLH (International Society of Laboratory Haematology) comme méthode de référence. Elle implique l'utilisation d'un ratio entre plaquettes marquées et globules rouges ainsi que la concentration en globules rouges fournie par un analyseur d'hématologie. Cette technique dépend donc de la précision et de l'exactitude de cette dernière mesure et n'est pas adéquate pour la numération des concentrés plaquettaires.

Les techniques de mesure de concentration cellulaire en cytométrie en flux en simple plateforme utilisent des billes de calibration. Cependant, certains cytomètres sont capables de mesurer directement une concentration cellulaire absolue sans l'utilisation de standard interne. C'est le cas du cytomètre en flux Accuri C6 (BD Biosciences) muni d'une pompe péristaltique contrôlée par un microprocesseur capable de mesurer le volume de la préparation analysée.

Nous avons montré que la numération plaquettaire absolue et directe réalisée en simple plateforme sur l'Accuri C6 est une méthode exacte, répétable et linéaire sur une large gamme de concentrations et ce, tant pour les échantillons de sang total que pour les concentrés plaquettaires.

Cette méthode n'emploie pas de billes de calibration et évite donc les problèmes de sédimentation différentielle liés à leur utilisation. En routine, cette technique permet l'évaluation de nouveaux analyseurs d'hématologie et fournit une numération plaquettaire exacte lorsque les mesures de concentration plaquettaire sont mises en difficultés entre autres par des débris de globules rouges ou de globules blancs ou par la présence de grosses plaquettes.

Cependant, certaines variables techniques sont à prendre en considération : cette méthode en simple plateforme est influencée par la viscosité de l'échantillon analysé, par le niveau de la préparation dans le tube d'acquisition, par le type de firmware installé sur le cytomètre et par la qualité du pipetage. Par conséquent, un facteur de calibration doit être appliqué au comptage plaquettaire absolu en fonction des conditions d'utilisation et du type d'échantillon analysé.

BIBLIOGRAPHIE

Chiaki TANAKA and Keiji FUJIMOT, Reference Method for Platelet Enumeration; *Sysmex Journal International* 2001, Vol. 11 N°1 : 33-39

Paul Harrison and col., An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. *American Journal of Clinical Pathology*, 2001 Mar; 115(3):448-59

H.C. Segal and col., Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion; *British Journal of Haematology*; 2005; 128: 520-525

Pieter F. van der Meer and col; A flow cytometric method for platelet counting in platelet concentrates, *Transfusion*. 2012 Jan; 52(1):173-80

ANALYSE DES DONNEES, APPROCHE STATISTIQUE

ESTHER ALVARO SOPUERTA, CliniSciences.



BIBLIOGRAPHIE

LA MALADIE RESIDUELLE DES LAL : DU STIC 5 A 10 COULEURS

ISABELLE ARNOUX



BIBLIOGRAPHIE

IMMUNODEFICIENCIES

ULRICH SACK, STEPHAN BORTE, ANDREAS BOLDT, FRANKA KAHLENBERG, MICHAEL BORTE, Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Institut für Klinische Immunologie, Johannisallee 30, 04103 Leipzig GERMANY

Monitoring of HIV patients is well established in clinical laboratories and contributed to implementation of flow cytometry in medical diagnostics. Primary immunodeficiencies are highly heterogeneous, more the 250 mutations are known today; therefore, setting up consensus panels for diagnosis of such patients took a longer time and was dependent on available multi colour cytometers.

Here, we describe how we diagnose primary immunodeficiencies in children and adults. We established validated panels. In combination with serological and genetic methods, patients suspicious on immunodeficiencies undergo a standardized but individual diagnostic procedure.

In future, we expect European consensus panels that make generation of reference values easier and help to speed up diagnostic process.

BIBLIOGRAPHIE

Borte, S., et al. "Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency." Blood 114.19 (2009): 4089-98.

Borte, S., et al. "Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR." Blood 119.11 (2012): 2552-55.

Sack U, Tárnok A, Rothe G (eds): Cellular Diagnostics. Basics, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Basel, Karger, 2009

ETUDE PRECLINIQUE DE LA CAPACITE DE L'IL-7 RECOMBINANTE HUMAINE A RESTAURER LES FONCTIONS LYMPHOCYTAIRES AU COURS DU CHOC SEPTIQUE

ANNE-PERRINE FORAY, ASTRID VILLARS-MECHIN, FABIENNE VENET, GUILLAUME MONNERET: Hospices Civils de Lyon, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, Hôpital E Herriot et Hospices Civils de Lyon - Université Claude Bernard Lyon I, EAM 4174, Lyon, France

ALAIN LEPAPE: Hospices Civils de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, EAM 4174, Lyon et Hospices Civils de Lyon, Services de Réanimation, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

CHRISTOPHE MALCUS, FRANÇOISE POITEVIN-LATER: Hospices Civils de Lyon, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, Hôpital E Herriot, Lyon, France

INTRODUCTION

Les états septiques sévères représentent la première cause de mortalité en réanimation. Une réponse immunitaire complexe est initiée au cours du sepsis et un état d'immunosuppression sévère se développe incluant des dysfonctions lymphocytaires (augmentation de l'apoptose, lymphopénie, anergie, augmentation du pourcentage de cellules T régulatrices) dont l'intensité et la durée sont corrélées avec le développement d'infections secondaires et la mortalité. L'interleukine-7 est une cytokine possédant d'importantes propriétés immunostimulantes (augmentation du nombre et des fonctions lymphocytaires). L'IL-7 recombinante humaine (IL-7rh) est actuellement testée dans des essais cliniques de phase I et II en cancérologie et lors d'infections virales chroniques. Chez l'individu sain, le traitement par l'IL-7rh n'a pas montré d'effet secondaire majeur à ce jour.

OBJECTIF

Le but de l'étude est de déterminer *ex vivo* les effets de l'IL-7rh sur les fonctions lymphocytaires T de patients en choc septique.

METHODE

Après isolement des cellules mononucléées du sang périphérique et stimulation *via* le TCR, l'effet de l'IL-7rh sur la prolifération des cellules T CD4+ et CD8+, la production d'IFN-gamma par les lymphocytes T CD8+, la phosphorylation de STAT5 et l'expression de Bcl-2 par les cellules T ont été mesurés par cytométrie de flux. Les résultats obtenus chez des patients adultes admis en choc septique ont été comparés à ceux obtenus chez des sujets adultes sains.

RESULTATS

13 patients en choc septique et 14 sujets sains ont été inclus dans l'étude. Les patients en choc septique présentaient des dysfonctions lymphocytaires marquées : diminution de la prolifération des cellules T CD4+ et CD8+, diminution de la production d'IFN-gamma par les cellules T CD8+, diminution de la phosphorylation de STAT5 et de l'expression de Bcl-2 après stimulation *via* le TCR. Après incubation avec l'IL-7rh, les fonctions lymphocytaires étaient significativement restaurées chez les patients. En effet, l'IL-7rh induisait une augmentation de la prolifération lymphocytaire T et une restauration de la production d'IFN-gamma. Enfin, l'induction de l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT5 dans les cellules T était rétablie chez les patients.

CONCLUSION

Ces observations *ex vivo* illustrent la capacité de l'IL-7rh à rétablir des fonctions lymphocytaires altérées au cours du choc septique chez l'homme. Elles suggèrent qu'une immunothérapie utilisant l'IL-7rh pourrait améliorer les réponses cellulaires T au cours du sepsis et contribuer à une amélioration de la survie au cours de ces états dont la mortalité reste très élevée.

BIBLIOGRAPHIE

- Hotchkiss, R.S., Coopersmith, C.M., McDunn, J.E. & Ferguson, T.A. *Nat Med* 15, 496-497 (2009).
Hotchkiss, R.S. & Opal, S. *N Engl J Med* 363, 87-89 (2010).
Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. & Lepape, A. *Mol Med* 14, 64-78 (2008).
Mackall, C.L., Fry, T.J. & Gress, R.E. *Nat Rev Immunol* 11, 330-342 (2011).
Unsinger, J.M., et al. *J Immunol* 184, 3768-3779 (2010).

RECEPTEURS TAM ET REPONSE IMMUNITAIRE DES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE

CAROLINE GUIGNANT, FABIENNE VENET, JULIE DEMARET, GUILLAUME MONNERET : Hospices Civils de Lyon, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, Hôpital E Herriot, Lyon et Hospices Civils de Lyon, Université Claude Bernard Lyon, EAM 4174, Lyon, France.

SEVERINE PLANEL : Hospices Civils de Lyon, Services de Réanimation, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France.

ALAIN LEPAPE : Hospices Civils de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, EAM 4174, Lyon et Hospices Civils de Lyon, Services de Réanimation, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France.

INTRODUCTION

Les états septiques constituent un véritable problème de santé publique de par leur incidence en constante augmentation et le fort risque de mortalité qui leur est associé (environ 40% de décès pour le choc septique). La réponse immunitaire au cours du choc septique est complexe et fait intervenir de multiples mécanismes. Nous avons choisi de nous intéresser à la protéine S (co-facteur de la protéine C) qui intervient dans les mécanismes de la coagulation, les réponses immunitaire et vasculaire, trois systèmes clés dans la physiopathologie septique. Sur le versant immunitaire, la protéine S et son homologue protéique Gas-6 interagissent avec les récepteurs tyrosine-kinases de la famille TAM (Tyro3, Axl, Mer). Ces récepteurs possèdent des propriétés immunorégulatrices sur la voie d'activation intracellulaire induite par le LPS.

OBJECTIF

Le but de ce travail était d'étudier le rôle des récepteurs dans la physiopathologie du choc septique.

PATIENTS ET METHODES

L'expression des récepteurs TAM a été mesurée par cytométrie en flux à la surface des leucocytes circulants de patients en choc septique (n=50) ainsi que par RT-PCR (ARNm). *Ex vivo*, l'expression des récepteurs TAM a été évaluée après incubation de cellules de volontaires sains en présence de plasmas septiques ou de lipopolysaccharide (LPS). Enfin, en réponse à une stimulation par du LPS en présence de Gas-6, la production de TNF- α et d'IL-10 par des cellules de patients en choc septique a été dosée.

RESULTATS

Au niveau protéique, l'expression du récepteur Mer est augmentée sur les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les monocytes des patients en choc septique. Cette augmentation est confirmée au niveau ARNm et est reproduite *ex vivo* sur les monocytes de sujets sains après incubation avec du plasma septique. *Ex vivo*, il a été observé qu'après stimulation des cellules de patients avec du LPS, la protéine Gas-6 recombinante humaine augmente la production d'IL-10, ce qui n'est pas observé chez les sujets sains. La production de TNF- α n'est pas modifiée par Gas-6.

CONCLUSION

Cette étude est la première à montrer une augmentation de l'expression protéique du récepteur Mer sur les monocytes et les PNN des patients en choc septique ; augmentation qui a pu être reproduite *ex vivo*. Si des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer l'effet modulateur des récepteurs TAM chez l'homme, ces résultats préliminaires indiquent une implication probable des récepteurs TAM dans la régulation immuno-inflammatoire qui se met en place lors d'un choc septique.

BIBLIOGRAPHIE

Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):327-36.

Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell.* 2007; 131(6):1124-36.

PHENOTYPES DES BASOPHILES AU REPOS ET ACTIVES

CLAUDE LAMBERT, Labo Immunologie, CHU et Ecole Nationale Supérieure des Mines, UMR-CNRS FRE 3312, LPMG; SFR 143 INSERM IFRESIS ; Saint Etienne, France.

Compte tenu des risques de certains tests de provocation d'allergie, il a été proposé de pratiquer des tests in vitro. La cytométrie avec ses facilités a permis de proposer des alternatives au test historique de libération d'histamine. Le principe du test est assez simple : les basophiles circulants sont mis en contact avec l'allergène. En cas d'allergie, les basophiles qui portent des IgE spécifiques à leur surface, sont immédiatement activés et dégranulent. Cette dégranulation peut être mesurée par cytométrie en flux: deux étapes 1 – il faut identifier les basophiles qui sont relativement rares et manquent de marqueurs spécifiques. 2 – il faut mesurer leur dégranulation qui s'exprime à la surface par augmentation forte d'expression de CD203c et brusque apparition de CD63, une LAMP normalement exprimée exclusivement à l'intérieur des granules.. Le test a été largement validé. Plusieurs kits sont disponibles qui utilisent des combinaisons différentes rendant les résultats un peu confus à analyser. Les tests comparatifs sont méthodologiquement presque impossibles à effectuer.

Le but de cette étude est de comparer les 3 principales stratégies de tests de dégranulation des basophiles en un seul tube et marquage multiple.

Nous avons ainsi comparé les sensibilités et spécificités des 3 stratégies d'identifications (CRTH2, CD123, CCR3) des basophiles et de leur activation CD63 et CD203c.

Les résultats encore préliminaires montrent que : 1 – le marquage combiné est possible bien qu'un peu délicat. 2 – L'identification des basophiles est largement équivalente quel que soit le protocole utilisé. 3 – L'activation est similaire dans les 3 démarches.

Au total, les différents tests disponibles devraient donner des résultats tout à fait comparables. La limite actuelle reste dans la standardisation des méthodes et surtout des préparations allergéniques.

CONCLUSION :

Le test d'activation des basophiles, très sensible et reproductible devrait arriver à maturité pour une utilisation de routine déjà pratiquée dans plusieurs CHU.

BIBLIOGRAPHIE

Mikkelsen S, Bibby BM, Dolberg MK, Dahl R, Hoffmann HJ. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clin Mol Allergy*. 2010 Feb 16;8(1):2

Ocmant A, Peignois Y, Mulier S, Hanssens L, Michils A, Schandené L. Flow cytometry for basophil activation markers: the measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy. *J Immunol Methods*. 2007 Mar 30;320(1-2):40-8.