CYTIMA 2014

15ème Journées stéphanoises de cytométrie et imagerie cellulaire et tissulaire

14 – 15 MAI 2014

Le Grand Cercle Place de l'Hôtel de ville
42000 Saint-Etienne

Comité scientifique

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

Laboratoire d'Immunologie	Claude LAMBERT
Laboratoire d'Hématologie	Lydia CAMPOS
Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques	Michel PEOC'H

Ecole Nationale Supérieure des Mines, Saint-Etienne

UMR CNRS LGF 5307 / CIS	Yann GAVET
UMR CNRS LGF 5307 / SPIN	Johan DEBAYLE
UMR CNRS LGF 5307 / SPIN	Jean-Charles PINOLI

Faculté de médecine, Saint-Etienne

Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes	Bruno POZZETTO

CHU Saint-Étienne

Ecole Nationale Supérieure des Mines SAINT-ETIENNE

INSTITUT Mines-Télécom

Université Jean Monnet SAINT-ETIENNE

15èmes Journées Stéphanoises de cytométrie

Imagerie cellulaire et tissulaire - Cytométrie en flux

Mercredi 14 mai

8 h 15 Ouverture

Session 1 : J.-F. MAYOL, J.-C. PINOLI ..... 8 h 45 - 10 h 30
Spectrométrie Raman en dermatologie : Elisa CINOTTI, J.-L. PERROT, B. LABEILLE
Microscopie confocale et pathologie cérébrale : Fabien FOREST
Etude d'interactions entre protéines par FRET : Annabelle SEQEIRA (Dijon)
La cellule vue par le cytomètriste : Gérard LIZARD (Dijon)
In vivo confocal cytometry : Hedi GHARBI (Cellvizio)

Pause café

Session 2 : B POZZETTO , T. BOURLET ..... 11 h 00 - 12 h 30
Intérêt clinique de l'analyse du LBA par CMF : Jean-Michel VERGNON
Immunomonitoring Liquide Broncho Alvéolaire par CMF : Bruno BRANDO (Milano)
Lymphocytes des muqueuses et HIV : Delphine VERGNON, A. GIRARD (GIMAP)
Innate Lymphoid Cells (ILC) des muqueuses : Catherine FARNARIER (Marseille)

Pause repas et visite des posters

Session 3 : J. NUNES, B. BRANDO ..... 14 h 00 - 15 h 30
Sous populations lymphocytaires et vieillissement : Pol APOIL (Toulouse)
Contribution to diagnostic of chronic immunodeficiencies : Ulrich SACK (Leipzig)
Immunomodulation par probiotique Lcr35 : Thomas BERTRAND (Clermont-Fd)
Souris humanisées et études précliniques : J.-François MAYOL (TransCure bioServices Archamps)

Pause café

Session 4 : J DEBAYLE, G LIZARD ..... 16 h 00 - 17 h 30
Organisation de la certification en milieu industriel : Bruno LEMOINE
Cytomique et criblage toxicologique : Enrique O'CONNOR (Valencia)
Clusters hiérarchiques au service de l'immunomonitoring : Jacques NUNES (Marseille)

18 h 00 Conclusions

Jeudi 15 mai

8 h 30 Ouverture

Session 1 : Rare et difficile : B. CHATELAIN, D. GUYOTAT ..... 8 h 45 - 10 h15
Profil des cellules souches dans le diagnostic et suivi de LAM : Adriana PLESA (Lyon)
Maladie résiduelle et LAL : Chantal FOSSAT (Marseille)
Maladie résiduelle et LLC : Rémi LETESTU (Paris, Bobigny)
Leucémie à LGL CD4+ : Françoise SOLLY

Pause café

Session 2 : M.-C. JACOB, L. CAMPOS ..... 10 h 45 - 12 h 00
Myelodysplasie : Carmen AANEI
Comment bien compter des événements rares ? : Bernard CHATELAIN (Belgique)
Cellules NK et Myélome traité par Lénalidomide : Sébastien VIEL (Lyon sud)
Thrombopénies induites par l'héparine (TIH) : Aurélie MONMARTIN
Test de résistance au Clopidogrel par étude de phosphorylation : Caroline PEILLON (CH Annecy)
Nouveaux fluorochromes et formats d'anticorps : B. LAYRAC (BD Biosciences)

Pause repas

Session 3 : C. FARNARIER , U. SACK ..... 14 h 00 - 15 h 30
Lymphocytes T CD4+CD8+ : M-Christine JACOB (Grenoble)
Lymphohystiocytose hémophagocytaire : M.Nathalie KOLOPP SARDA (Lyon sud)
TTL : Thymidine tritiée vs edU par CMF : Fanny POUJOL (Lyon HEH)
Phosphorylation de stat-5 et sepsis : Guillaume DUPONT (Lyon HEH)
Un outil d'aide au diagnostic de HPN : Katarzyna MOSIEWICZ (Alexion eu)

Pause café

Session 4 : J. BIENVENU , J. HAFID ..... 16 h 00 - 17 h 30
Imagerie des Ostéoclastes : Daniel CHAPPARD (Angers)
Panels d'Anticorps déshydratés : J. VIGNES (Beckman Coulter)
Détection de cellules tumorales circulantes : Adriana PLESA (Lyon)
Marqueurs embryonnaires et cellule souche hématopoietique : Tiphanie PICOT (St Etienne)

18 h 00 Conclusions

APPLICATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN EN DERMATOLOGIE

Cinotti E., Labeille B., Perrot JL., Cambazard F.
Service de dermatologie, CHU Saint-Etienne

La Spectroscopie Raman (SR) est une technique qui analyse la composition chimique des matériaux et qui est basée sur la détection des vibrations moléculaires. Elle analyse le rayonnement diffusé résultant de l'interaction entre une source de lumière monochromatique incidente et les molécules du milieu à étudier. L'échange d'énergie entre le faisceau de lumière incident et le milieu traversé entraine une modification de la longueur d'onde de la lumière diffusée (effet Raman) qui est caractéristique et qui se traduit par un spectre du matériel étudié[1]. La SR donne des informations chimiques et structurales, qualitatives et quantitatives, sans nécessité de contact avec l'échantillon observé et sans préparation particulière de l'échantillon. De plus l'analyse peut être effectué ex vivo, mais aussi in vivo car elle n'est pas destructive.

La SR est couramment utilisée en chimie, puisque l'information vibratoire est spécifique aux liaisons chimiques, mais elle rejoint d'autres domaines tels que la criminologie (recherche de traces biologiques), l'art (analyse des œuvres d'art pour restauration), la gemmologie (authentification des pierres précieuses), la biologie et la médecine.

En particulier, en dermatologie elle a été utilisée in vivo et ex vivo pour des études de physiologie et de pathologie. Elle a été largement utilisée pour l'évaluation de la teneur d'hydratation cutanée et pour l'étude de la fonction barrière de la peau. Elle s'est avérée intéressante dans des études biopharmaceutiques concernant les taux de pénétration des médicaments et les changements biochimiques induits par un produit topique[2]. De plus en cancérologie elle a démontré une bonne sensibilité et spécificité pour le diagnostic du carcinome basocellulaire et du mélanome[3]. Une nouvelle application concerne l'identification chimique des corps étangers[4] dans la peau et des substances endogènes accumulées lors des maladies de stokage[5].

La SR peut être couplée à la microscopie confocale en permettant d'obtenir une analyse chimique des structures microscopiques observée au microscope. Des prototypes de laboratoire permettent de coupler ces deux techniques sur une caméra manuelle in vivo[6]. Dans le futur on pourra acquérir des images microscopiques avec une identification des spectres chimiques correspondants.

A ce jour, il est aussi possible d'obtenir une image chimique basée sur le spectre Raman d'un échantillon. Un spectre complet est acquis à chaque pixel de l'image et des images en fausses couleurs sont créées sur la base de la composition chimique de l'échantillon observé.

References

1. Schrader, B. Infrared and Raman Spectroscopy. New York: VCH Publishers Inc., 1995.
2. Förster M, Bolzinger M-A, Montagnac G, Briançon S. Confocal Raman microspectroscopy of the skin. Eur J Dermatol. 2011;21:851–63.
3. Calin MA, Parasca SV, Savastru R, Calin MR, Dontu S. Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2013;139:1083–104.
4. Cinotti E, Labeille B, Perrot JL, Boukenter A, Ouerdane Y, Cambazard F. Characterization of cutaneous foreign bodies by Raman spectroscopy. Skin Res Technol 2013;19:508–9.
5. Cinotti E, Perrot JL, Labeille B, Espinasse M, Ouerdane Y, Boukenter A, et al. Optical diagnosis of a metabolic disease: cystinosis. J Biomed Opt. 2013;18:046013.
6. Patil CA, Arrasmith CL, Mackanos MA, Dickensheets DL, Mahadevan-Jansen A. A handheld laser scanning confocal reflectance imaging-confocal Raman microspectroscopy system. Biomed Opt Express. 20121;3:488–502.

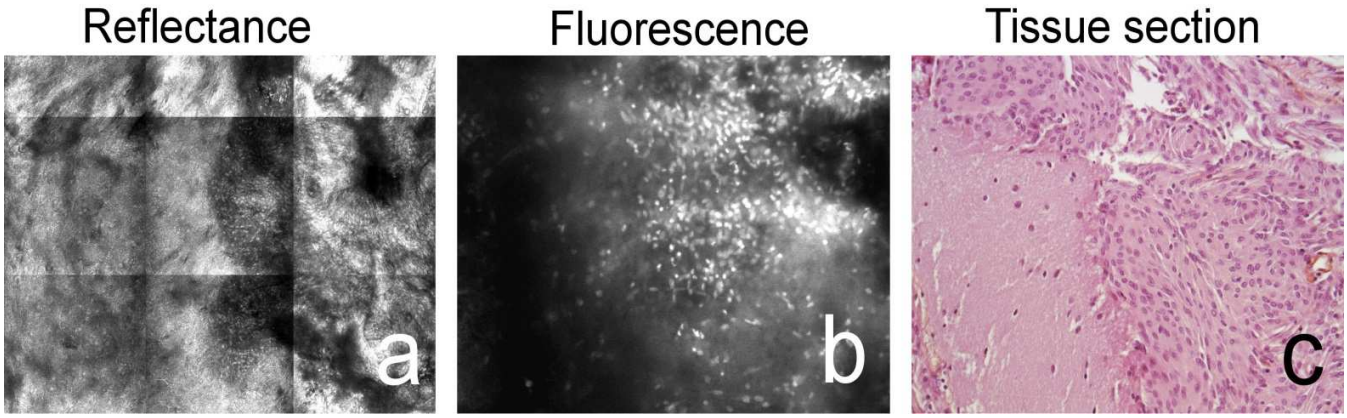
IMAGERIE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE EX VIVO « RAPIDE » EN PATHOLOGIE CHIRURGICALE NEUROPATHOLOGIQUE

Fabien Forest[1], Elisa Cinotti[2], Cyril Habougit[1], Bruno Labeille[2], François Casteillo[1], Jean-Luc Perrot[2], Violaine Yvorel[1], François Vassal[3], Christophe Nuti[3], Michel Peoc'h[1]

Services d'anatomie et cytologie pathologiques[1], de dermatologie[2] et de neurochirurgie[3]. CHU de Saint Étienne, Hôpital Nord, Avenue Albert Raymond, 42055 Saint Étienne CEDEX 2.

Les microscopes confocaux ont une utilisation en recherche depuis de nombreuses années. Récemment, cette technologie a été adaptée en pratique clinique quotidienne avec le développement de microscopes confocaux utilisables au lit du patient capables de réaliser de l'imagerie in vivo et ex vivo sur échantillons. Les microscopes confocaux ex vivo permettent d'étudier en moins de 15 min des prélèvements tissulaires de grande taille avec une résolution de 2µm. Après immersion dans l'acide acétique puis l'acridine orange du tissu prélevé, nous avons utilisé le microscope MAVIG VivaScope 2500®. 20 prélèvements neurochirurgicaux (6 tumeurs gliales infiltrantes, 9 méningiomes, 3 métastases de carcinomes, 1 métastase de mélanome, 1 abcès aspergillaire et 1 hémangioblastome) ont été étudié par cette technique.

Nous présentons les résultats comparatifs entre l'imagerie en microscopie confocale ex-vivo et l'examen histologique. Nos résultats montrent que le tissu lésionnel peut être identifié en microscopie confocale ex vivo et que certains critères de grading histologique des tumeurs cérébrales peuvent être appréciés. Nous aborderons ses applications possibles en neuropathologie.



Exemple : Envahissement du tissu cérébral (critère de grading) par un méningiome atypique visualisé en réflectance, fluorescence et sur coupes histologiques.

FRET IN FLOW CYTOMETRY.

Anabelle Sequeira-LeGrand
Plateforme de Cytométrie, Université de Bourgogne

Protein-protein interaction play a central role in the regulation of all biological processes and represents a promising class of therapeutic targets. Therefore, methodological and conceptual advances are required to chart comprehensive protein interaction maps, understand the complexity of networks and characterize protein modulators.

Protein interactions at the molecular level can be measured by fluorescence resonance energy transfer (FRET) using a pair of fluorescent proteins, such as CFP and YFP, in which the emission of CFP significantly overlaps the excitation spectrum of YFP. The resulting energy given off from the donor CFP protein can excite the acceptor YFP protein when both are closely approximated. The quenching of emission of the donor CFP is directed related to the efficiency of energy transfer and inversely proportional to the six power of the distance between donor and acceptor proteins.

The combination of fluorescence Resonance Energy Transfert (FRET) and Flow Cytometry offers a statistically robust approach to study proteins associations and dynamic molecular process in living cells.

Taken together, in this work we have used the donor-acceptor pair CFP vs. YFP, to develop a new methodological approach using flow Cytometry to calculate FRET efficiency in living cells. Different steps to FRET calculations are modelized in the ***FRETinFLO*** software, in which instrument standardization, experimental design and proper controls are introduced.

Using this biological model, we propose an algorithm based in approaches described in the past by Szollosy et al, and Gordon et al respectively. We have introduced constant correction factors specifics for both: instrument of measuring and partners involved in FRET process and supplied double selection criteria to identify viable FRET positive cells.

This strategy provides a new insight to obtain robust calculations of FRET efficiency using data from Flow Cytometry and constitute a potent tool for develop high content and high-throughput assay for drug discovery programs and clinical screenings.

References

1. *Nagy P, Bene L, Hyun WC, Vereb G, Braun M, Antz C, Paysan J, Damjanovich S, Park JW, Szollosi J. Novel calibration method for flow cytometric fluorescence resonance energy transfer measurements between visible fluorescent proteins.* ***Cytometry Part A 2005; 67A: 86-96.***
2. *Gordon, G.W., G. Berry, X.H. Liang, B. Levine, and B. Herman. 1998. Quantitative Resonance Energy Transfer measurements using fluorescence microscopy.* ***Biophys. J. 74:2702-2713.***

LA CELLULE VUE PAR LE CYTOMETRISTE

Amira ZARROUK [1, 2] , Samia HAJ AHMED [1, 2] , **Gérard LIZARD** [1]

Université de Bourgogne, Dijon

1- Laboratoire 'Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique'EA7270 / Université de Bourgogne / INSERM, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, Dijon, France ;
2- Université de Monastir, Faculté de Médecine, LR12ES05-Lab-NAFS, Monastir, Tunisie

Vue par les cytomètres en flux et quel que soit le type de fluidique, la cellule se résume à un ensemble de signaux électriques qui sont la résultante de signaux de diffraction et de signaux de fluorescence collectés et mesurés cellule par cellule au niveau des photomultiplicateurs. Ces signaux digitalisés sont ensuite traités et représentés sous forme d'histogrammes le plus souvent mono-paramétriques et bi-paramétriques. Bien que les cellules soient prises en compte de manière individuelle, les représentations de cytométrie en flux transcrivent les caractéristiques de populations cellulaires. Même si ces dernières sont homogènes pour certains paramètres, cela n'exclue pas des différences sur d'autres paramètres.

Aborder la cellule en exploitant ses propres caractéristiques, cellule par cellule, peut néanmoins s'envisager. Dans ce contexte, l'étude du cytome (caractéristiques morphologiques, antigéniques et fonctionnelles d'une cellule à un moment donné) via la cytomique, en faisant appel à la cytomètrie en flux, peut permettre d'évaluer les caractéristiques individuelles des cellules. Cette approche est prometteuse mais encore peut exploitée en raison des nouvelles formes de traitements de données qu'elle impose. Ses applications potentielles sont néanmoins multiples : caractérisation des cellules souches, des cellules tumorales….

Actuellement, de nouvelles formes de cytométrie en flux se développent (cytométrie spectrale, cytométrie spectrale associée à l'imagerie (technologie AMNIS), cytométrie de masse). Ces technologies de cytométrie en flux génèrent de nouvelles données permettant une meilleure caractérisation cellulaire allant au-delà des paramètres habituellement mesurés. La spectrométrie de masse permet ainsi d'envisager une meilleure approche du métabolisme cellule par cellule. La technologie AMNIS fournit déjà des informations proches de celles obtenues par microscopie et renseigne sur des paramètres morphologiques et topographiques.

Il apparait donc que la cytométrie en flux est une approche de caractérisation cellulaire en perpétuelle évolution. Vue par le cytométriste, les renseignements fournis au niveau de la cellule sont donc à même de faire évoluer de manière importante les connaissances sur la cellule tant en biologie qu'en médecine.

INTERET CLINIQUE DE L'ANALYSE DU LBA PAR CMF

Jean Michel VERGNON

Service de pneumologie CHU Saint-Etienne

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN LUNG INTERSTITIOPATHIES.

Bruno Brando and **Arianna Gatti.**

Hematology Laboratory and Transfusion Center, Legnano Hospital (Milano), Italy.

Determining the cellular content and the distribution of immune cell subtypes of lung cells obtained by bronchoalveolar lavage (BAL) is of great clinical usefulness, particularly for evaluating the cause and the course of interstitial lung diseases.

The current technical standard of BAL analysis includes the injection of a predefined amount of warmed saline (i.e. 50 mL x 3 times), the calculation of the % amount of the retrieved fluid for representation, the evaluation of immune cells absolute count and the analysis of the immune cell differential, with emphasis on functional T cell subsets.

Flow Cytometry is nowadays the method of choice to evaluate rapidly and with high accuracy the total immune cell numbers by single-platform analysis (80,000 - 200,000 per microliter in absence of active disease), the immune cell differential by CD45 /SSC analysis (Lymphocytes <10%, Macrophages >80%, Granulocytes < 5% in absence of active disease) and the Lymphocyte subsets (TCD3+ >70%, NK 5-15%, BCD19+ 5-15%). Determining TCD4+, TCD8+ and other functional lymphocyte subsets is also important because different groups of diseases can be differentiated according to the CD4/CD8 balance (i.e. Diseases with CD4+ prevalence: Active Sarcoidosis, Berilliosis, Asbestosis, Rheumatoid Arthritis, Tuberculosis. Diseases with CD8+ prevalence: Hypersensitivity Pneumonia, Collagen-tissue inflammation and Vasculitides, BOOP).

Moreover, in recent years a more in-depth Flow Cytometric analysis of functional, effector and regulatory T cell subsets has been developed, that enabled the evaluation of TH1/TH2 balance, of the TH17 helper T cells and Treg cell levels by surface phenotyping. TH17 cells from BAL have been demonstrated to participate in the alveolitis/granuloma formation in the lung in Sarcoidosis and possibly also in the evolution of the fibrotic process.

The technical, experimental and clinical implications of this new approach will be described and discussed, with emphasis on the inflammatory processes that accompany sarcoidosis and autoimmune disorders with lung involvement.

References:

Meyer KC et al. Am J Respir Crit Care Med 2012; 185: 1004-1014.
Reynolds HY. Curr Opin Pulm Med 2009; 15: 479-485.
Drent M et al. Semin Respir Crit Care Med 2007; 28: 486-495.
Facco M et al. Thorax 2011; 66: 144-150.

EVALUATION IMMUNO-VIROLOGIQUE DU RESERVOIR INTESTINAL DE PATIENTS INFECTES PAR HIV-1, EN FONCTION DU STADE D'IMMUNOSUPPRESSION A L'INSTAURATION DU TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL - ETUDE VIRECT

Delphine Vergnon[1,2], Alexandre Girard[1], Anne Depincé[1], Xavier Roblin[1,3], Emilie Del Tedesco[3], Anne Frésard[2], Claire Guglielminotti[2], Claude Lambert[4], Bruno Pozzetto[1,5], Frédéric Lucht[1,2], Stéphane Paul[1,4], Thomas Bourlet[1,5]

[1]Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes –GIMAP EA 3064, [2]Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, [3]Service de Gastro-Entérologie, [4]Laboratoire d'Immunologie, [5]Laboratoire de Virologie, CHU de Saint-Etienne, Université de Saint-Etienne, Université de Lyon.

Le GALT (tissu lymphoïde associé aux muqueuses) représente un réservoir majeur pour le virus HIV-1. L'objectif de notre étude est de comparer les caractéristiques cellulaires et virales du GALT rectal en fonction du taux de lymphocytes T $CD4^+$ (LT4) à l'instauration du traitement antirétroviral (TARV), chez des patients traités depuis plus d'un an et moins de 5 ans, sans antécédents de rebond virologique.

Chaque patient a bénéficié d'un prélèvement sanguin puis d'une ano-rectoscopie, avec réalisation de 6 biopsies au niveau rectal. L'ADN HIV total et l'ARN HIV intra-cellulaire ont été quantifiés par PCR en temps réel dans les échantillons sanguins et rectaux. La répartition en lymphocytes T $CD4^+$, $CD8^+$, Th17, T régulateurs, T $CD4^+/p24^+$, T $CD8^+$/ $PD\text{-}1^+$ a été étudiée dans ces prélèvements par cytométrie de flux.

Douze patients ont été inclus à ce jour, 4 ayant débuté le TARV avec plus de 350 LT4/mm^3, 3 avec un taux entre 200 et 350/mm^3 et 5 avec un taux inférieur à 200/mm^3. La quantité moyenne d'ADN HIV rectal était plus faible dans le groupe ayant débuté le traitement avec un taux de LT4 sanguin > 350/mm^3que dans celui avec un taux <200/mm^3 (3,49 vs 3,74 log_{10} copies/10^6 cellules). Une corrélation inverse a été observée entre l'épuisement des lymphocytes T $CD8^+$ du GALT (LT $CD8^+/PD\text{-}1^+$) et le taux de LT4 à l'instauration du TARV ainsi qu'avec le ratio moyen LTh17/LTreg au niveau rectal.

Ces résultats préliminaires suggèrent que l'instauration du TARV à un taux de LT4 sanguin supérieur à 350/mm^3 préserve l'immunité muqueuse à moyen terme. La taille du réservoir HIV rectal semble également être influencée par le taux de LT4 à l'initiation du traitement.
Les perspectives de cette étude sont (1) de poursuivre les inclusions, (2) compléter les marqueurs immuno-virologiques, (3) rechercher des co-infections et (4) étudier l'environnement inflammatoire.

LYMPHOCYTES DES MUQUEUSES ET HIV

Alexandre Girard[1], Delphine Vergnon[1,2], Anne Depincé[1], Xavier Roblin[1,3], Emilie Del Tedesco[3], Laurent Cotte[6], Claude Lambert[4], Bruno Pozzetto[1,5], Frédéric Lucht[1,2], Christian Genin[1,4], Thomas Bourlet[1,5],Stéphane Paul[1,4]

[1]Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes –GIMAP EA 3064, [2]Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, [3]Service de Gastro-Entérologie, [4]Laboratoire d'Immunologie, [5]Laboratoire de Virologie, CHU de Saint-Etienne, Université de Saint-Etienne, Université de Lyon, [6]Service des Maladies Infectieuses et Tropicales de l'hôpital de la Croix Rousse , CHU de Lyon

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) s'accompagne dès la primo-infection d'une altération de l'immunité au niveau du système digestif et de la constitution d'un compartiment viral dans le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue). Le GALT est le réservoir viral le plus important du HIV-1 et représente l'obstacle principal à l'éradication du virus. Il abrite 40 à 60% des lymphocytes T $CD4^+$ de l'organisme, et notamment les lymphocytes $CD4^+$ $CCR5^+$, cellules cibles préférentielles du virus. Le GALT est également le site principal de la réaction immunitaire initiale. A la phase aiguë de l'infection, l'intensité de la réplication virale aboutit à une perte de plus de 50% des lymphocytes T $CD4^+$ du tube digestif. Cette déplétion, beaucoup plus rapide que celle observée dans le sang, s'accompagne de dommages structuraux au niveau de la muqueuse digestive. Les mécanismes de cette disparition rapide restent à ce jour partiellement compris. Le rôle prépondérant des interactions entre l'intégrine α4β7 et la gp120 vient d'être démontré dans l'infection par le virus HIV-1, notamment son implication dans la destruction ciblée des LT $CD4^+$ du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale.

Les mécanismes liés à cette disparition rapide restent à ce jour partiellement compris mais l'intégrine α4β7 étant fonctionnellement liée via le homing des lymphocytes T CD4 avec chacun des sites impliqués dans les premières phases d'infection aigue du virus VIH, une hypothèse séduisante serait de corréler l'expression de cette intégrine avec la dissémination virale et la lyse lymphocytaire. L'intégrine α4β7 participe au « homing » spécifique des lymphocytes B et T dans la muqueuse intestinale *via* son interaction avec l'adressine muqueuse MAdCAM-1 présente à la surface des cellules endothéliales vasculaires intestinales. Les LT $\alpha4\beta7^+$ sont les cibles privilégiées du virus VIH-1 au niveau intestinal.

L'importance des liens entre l'intégrine α4β7, le GALT et les premières phases de l'infection suggère que l'interaction gp120/α4β7 joue un rôle crucial durant les phases précoces de l'infection. L'affinité de la gp120 pour α4β7 semble être un mécanisme important pour le virus VIH-1 permettant de cibler les cellules activées critiques pour la propagation et la diffusion du virus.

L'objectif de cette étude a pour but d'évaluer les modifications du phénotype lymphocytaire chez l'hôte infecté.

Ainsi, en collaboration des infectiologues de l'hôpital Nord de Saint Etienne et à l'hôpital de la Croix Rousse de Lyon, nous avons mis en place une étude des populations lymphocytaires

exprimant l'intégrine α4β7 dans le sang périphérique et dans des biopsies intestinales de coloscopie de patient atteint par le VIH. Nous souhaitons faire un suivi longitudinal sur 2 ans de chaque nouveaux cas en débutant l'étude le plus tôt après le diagnostic de l'infection. En effet, les modifications phénotypiques pourraient intervenir au moment de l'installation de la maladie dans l'organisme : durant la phase de primo-infection. A ce jour, aucune étude s'est intéressé aux les modifications phénotypiques des lymphocytes T et B au cours de l'infection.

Ainsi, nous avons déterminé 3 panels de cytométrie. Les 2 premiers panels vont permettre d'étudier l'évolution des différentes sous populations (α4β7, tropisme CCR5 ou CXCR4, marqueurs d'activation CD45RA) des lymphocytes T $CD4^+$, et des lymphocytes T Th17 (CCR6, CD103). Un troisième panel de cytométrie a été choisi pour évaluer la population de lymphocytes B (CD19, IgD, α4β7, CD38, CD5, CD27 (ou IgM)). A ce jour, nous suivons 4 primo-infectés, 1 Long Term Progressor et 13 patients ayant un statut de non répondeurs immunologique. Ces patients NRI sont susceptibles de présenter des différences phénotypiques aux niveaux de leurs lymphocytes pouvant expliquer leur faible taux de LT $CD4^+$ malgré un traitement anti-rétroviral. Les 3 panels d'anticorps sont aussi utilisés pour étudier ces mêmes populations lymphocytaires au niveau de biopsies intestinales de patient HIV^+.

A LA RECHERCHE DES INNATE LYMPHOID CELLS SANGUINES CHEZ L'HOMME ?

C. Piperoglou, C. Farnarier, F. Vély.

Laboratoire d'Immunologie Hôpital de la Conception UF Lymphocytes de l'immunité innée.

CIML équipe Pr E. Vivier : NK cells and innate immunity Marseille

La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative s'appuie en partie sur la sécrétion de cytokines par différentes populations de lymphocytes T. Différentes populations de lymphocytes T auxiliaires peuvent être définies en fonction de leur profil de sécrétion de cytokines. Les lymphocytes T_H1 qui produisent de l'IFNγ, de l'IL-2 et la lymphotoxineβ oriente vers une réponse de type 1 qui protège contre les pathogènes intracellulaires et qui est également impliquée dans de nombreuses pathologies auto-immunes. Les lymphocytes T_H2 qui produisent de l'IL-2, IL-4, IL-5,et de l'IL-13 oriente vers une réponse de type 2 qui est importante pour le contrôle des infections bactériennes ou parasitaires mais qui est également impliquée dans des pathologies telles que l'allergie et l'asthme. Une troisième sous population auxilliaire, les T_H17 produisent principalement l'IL17A,l'IL-22 et jouent un rôle important dans les défenses vis-à-vis de bactéries gram négatif et de certains champignons et dans les pathologies inflammatoires.

Récemment, une autre source de cytokine a été identifiée comme provenant de populations innées de lymphocytes appelés Innate Lymphoid Cells (ILC). Les ILC représentent de nouveaux effecteurs dont le rôle dans la mise en place de la réponse immune mucosale apparaît de plus en plus incontournable. En contact intime avec les cellules épithéliales des muqueuses respiratoires et intestinales, elles sont en première ligne pour répondre rapidement à toute perturbation de l'environnement qu'elle soit d'origine microbienne ou non, pathogène ou bénigne. Issues comme les lymphocytes B et T d'un progéniteur lymphoïde commun, elles s'en distinguent par l'absence de récepteurs spécifiques aux antigènes. Elles ne requièrent par conséquent aucune phase préalable d'activation et de sélection clonale sur la base de l'affinité de ces récepteurs pour l'antigène. Leurs fonctions effectrices reposent à la fois sur l'expression programmée de facteurs de transcription tels que T-bet, GATA-3 et RORγt et sur les cytokines libérées par les cellules myéloïdes et épithéliales environnantes. Ainsi, immédiatement disponibles et fonctionnelles, elles sont susceptibles d'intervenir plus précocement dans la réponse que les acteurs lymphocytaires B et T de la réponse adaptative. Ce qui justifie leur appellation de cellules « innées ».

Notre équipe a participé à la découverte de ces nouvelles populations lymphocytaires. Cette famille émergente comprend les ILC1 qui produisent de l'IFNγ, les ILC2 qui produisent des cytokines de type 2 (incluant l'IL-5 et l'IL-13) et les ILC3 qui produisent de l'IL-17 et/ou de l'IL-22. Les ILC2 jouent un rôle dans l'immunité antiparasitaire, l'asthme, l'allergie et dans la régénération tissulaire au niveau pulmonaire. Au cours d'une infection par le virus de la grippe chez la souris, ces cellules s'accumulent dans le poumon et participent à la protection et à la régénération de l'épithélium. Les ILC3 sont importantes dans la régénération épithéliale et l'immunité mucosale de part leur sécrétion de peptides antimicrobiens.

Bien que principalement présentes au niveau des tissus (poumon, intestins…), ces cellules sont détectables dans le sang. Nous avons mis au point une analyse 8 couleurs et l'analyse par cytométrie de flux permet d'identifier les principaux types d'ILC1, 2 et 3 à partir de cellules sanguines.

La modulation du nombre d'ILC dans le sang pourrait refléter des variations en nombre au niveau des tissus et servir de marqueurs pronostiques ou diagnostiques au cours de différentes pathologies auto-immunes ou inflammatoires. Il sera également intéressant de pouvoir suivre leur cinétique de reconstitution post-transplantation hématopoïétique puisqu'une partie de ces cellules est impliquée dans l'immunité des muqueuses et l'homéostasie épithéliale.

VARIATIONS OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS BETWEEN THE 3RD AND 7TH DECADES: RELATIVE INFLUENCE OF AGE, SEX AND CYTOMEGALOVIRUS SEROPOSITIVITY

Apoil P.A. [(1)(2)], Peres M.[(2)], Puissant B.[(1)(2)], Congy-Jolivet N.[(1)(2)], Bloom D. [(3)], Roubinet F.[(3)], Blancher A. [(1)(2)]

(1) : Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, EA 3034, Université Paul Sabatier, Toulouse 3, Toulouse, France
(2) : Laboratoire d'Immunologie, CHU de Toulouse, France
(3) : EFS Pyrénées-Méditerranée, Toulouse, France

We determined by flow cytometry the peripheral blood T, B and NK lymphocytes counts, as well as their various subpopulations for 246 healthy blood donors of both genders, aged 20 to 66, and whose cytomegalovirus serological status was known (103 donors were CMV+). In addition of absolute counts of T, B and NK cells, immunophenotyping was performed with four antibody panels of 8 antibodies each (24 distinct phenotypic markers in total), followed by analysis with a BD FACS Canto II flow cytometer. Cytometer settings were controlled and corrected daily by using various fluorescent beads, with automated adjustments of PMT voltages. Data validity was ensured through analysis of cytometry samples by two independent readers, using Diva and FlowJo softwares.

Gender had an influence on absolute counts of T, B and NK cells and on some subpopulations of T, B and NK lymphocytes. However, the most significant factors influencing T lymphocyte subpopulations were age and CMV serological status. The frequency of CMV seropositivity varied from 25-30% among young individuals (20-30 y.o.) to 50-55% in older blood donors (60-66 y.o.), with a higher frequency of seropositivity in women in most age decades. Progressive disappearance of circulating naïve T lymphocytes and accumulation of effector memory or terminally differentiated T cells was mostly dependant of age, and was present in both CD4+ and CD8+ populations. Rates of loss or accumulation of these cells were similar in CMV- and CMV+ individuals. However, for most age decades between 20 and 66, CMV+ individuals had higher absolute counts of T cells, higher frequencies of memory, and lower frequencies of naïve CD4+ and CD8+ T cells, compared to CMV- subjects. This major impact of CMV seropositivity on T lymphocytes subpopulations was confirmed by hierarchical clustering and discriminant function analysis.

In addition, about one-quarter of CMV+ individuals possess CD4+ T cells for which phenotypic characteristics are classically associated with "exhausted" CD8+ T lymphocytes, *i.e.* a re-expression of CD45RA and a loss of CD28 and/or CD27 expression. The frequency of these "EMRA" (Effector Memory CD45RA-revertant) CD4+ T cells can rise above 20% of all CD4+ T lymphocytes in some CMV+ subjects, but never exceeds 3% in CMV- individuals. For some individuals, we could verify the stability of the frequency of CD4+ "EMRA" lymphocytes for up to two years.

In accordance with epidemiological data, we hypothesize that most CMV+ individuals in our study were infected early in life, in infancy or young adulthood. Thus, in CMV+ individuals, older age is associated with a longer duration of exposure to cytomegalovirus, a virus known to reactivate periodically for decades after acute infection. Although CD4+ "EMRA" T cells are known to be also present during HIV infections or chronic hepatitis, in healthy blood donors from our study, only CMV seropositivity was associated with their presence in peripheral blood. This CD4+ "EMRA" T cell subpopulation, which is present in only a fraction of CMV+ individuals, is not a transient population, and could impair immune responses at advanced ages.

How genetic factors, CMV strains responsible for primo infection or re-infections, and environmental factors, influence the presence of this subpopulation is still to be determined.

CONTRIBUTION TO DIAGNOSTIC OF CHRONIC IMMUNODEFICIENCIES

Ulrich Sack[1,2], Michael Borte[3], Andreas Boldt[1,2], Stephan Borte[2,4]

[1]*Institute of Clinical Immunology, Department of Diagnostics, Medical Faculty at the University of Leipzig, Germany*
[2]*Translational Centre for Regenerative Medicine (TRM) at the University of Leipzig, Germany*
[3]*ImmunoDeficiencyCenter Leipzig (IDCL) at the Municipal Hospital St. Georg Leipzig, Germany*
[4]*Division of Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Karolinska Institutet at Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden*

Innate and chronic immunodeficiencies represent a group of heterogeneous dysfunctions of the immune system resulting in impaired defense on infections and tumors. Genetically determined disorders of the protective immune function, commonly referred as Primary Immuno Deficiency diseases (PID), and it have been recognised clinically already 60 years ago with the identification of X-linked agammaglobulinemia. Today, the group of PID involves over 280 distinct entities which are scattered to present as phagocytic disorders, complement deficiencies, T-cell deficiencies and – predominantly - antibody disorders. PID are not rare diseases; with a summarised prevalence ranging from 1 in 250 to 1 in 500. However, they are misdiagnosed in many cases because of their subtle clinical image and their prolonged course of disease, which often worsens the outcome. Although increasingly becoming appreciated as a major health problem, there is a lack of diagnostic procedures and sophisticated therapeutic perspectives that would allows upon earliest possible diagnosis and a satisfactory treatment of patients with primary immunodeficiency diseases.

Primary and acquired immunodeficiencies strongly influence prognosis and outcome of patients. The targeted identification of such patients represents a diagnostic challenge. Diagnostic strategies depend on the clinical presentation, patients' history, and age. Clinical manifestation of primary immunodeficiencies can start in early childhood but also in adults, based on severity and modifying conditions. Frequently, PID are characterised by hypogammaglobulinemia of the IgG, IgM, and/or IgA isotype, respectively, and a resulting clinical presentation consisting of recurrent and chronic infections, particularly of the respiratory, intestinal and genitourinary systems. Awareness of possibly underlying immunodeficiencies and targeted diagnostics is crucial for early diagnosis and therapy.

In children, majority of most severe immunodeficiencies can be detected by new born screening tests carry out with dried blood spot samples (DBSS). Serious impairment of the immune response due to inborn errors of T- or B-lymphocyte differentiation results in immunodeficiency syndromes such as Severe Combined Immunodeficiency (SCID) or Agammaglobulinemia (XLA, ARA). The fatal outcome of these syndromes – if undiscovered and untreated within the first year of life - and the availability of well-established treatment options justify a general newborn screening program for those severe immunodeficiency diseases. The assessment of T-cell receptor excision circles (TRECs) and Kappa-deleting recombination excision circles (KRECs) has been shown before to be of promise to detect the presence of T- and B-lymphocytes in a given sample. However, a validated newborn screening platform for the simultaneous measurement of TRECs and KRECs has not been introduced, so far. We started screening of DBSS 6 years ago. DNA extraction out of a single 3.2-mm punch from regular Whatman 903® filter cards is fully automated using a robotic workstation, followed by subsequent real-time triplex PCR analysis for TRECs, KRECs and the reference gene beta-actin.

All samples are analyzed in order to contain enough genomic DNA for reliable quantitation of TRECs and KRECs. Patients with known immunodeficiency diseases causing T- and/or B-lymphopenia (SCID, XLA, AT) had significantly reduced or absent levels of TREC and/or KREC copies and were unambiguously identified.

It has been clearly shown that detection of immune deficiencies during early life remarkably improves prognosis by less complications, better results in stem cell transplantation if required, and improved early starting replacement therapy in immunoglobulin deficiencies. That's why newborn screening programs based on detection of TREC and KREC copy numbers are in discussion to be introduced in general.

Lymphocytes can be diagnosed efficiently by flow cytometry in adults and in children suspicious on immunodeficiencies. Immunophenoptyping allows differentiation and functional description of immune cells, including lymphocytes, dendritic cells, monocytes, and polymorphonuclear cells. This is of particular relevance in diagnosis of immunodeficiencies, but also in autoinflammatory, autoimmune, and allergic diseases. For differential diagnosis, functional assays with lymphocytes and phagocytes are essential and can be done a simple and reproducible way.

We use a flow cytometric 8-tube-8-colour panel that allows detecting alterations in (i) the general lymphocyte overview; (ii) B-cell subpopulations; (iii) CD4- subpopulations; (iv) CD8-subpopulations; (v) regulatory T-cells; (vi) recent thymic emigrants; (vii) NK-cell subpopulations; and (viii) NK-cell activation markers. By using this approach, we analyzed patients' samples from children and adults for the following subpopulations: (i) CD3+,4+,8+,19+,16/56+ and activated CD4/8 cells; (ii) immature, naive, non-switched, switched, memory, (activated) CD21low, transitional B-cells, plasmablasts, plasmacells; (iii) naïve, central memory, effector, effector memory, TH1, TH2, CCR5+ CD4-cells, most of them by surrogate markers; (iv) naïve, central memory, effector, effector memory, CCR5+ CD8-cells and TH17 cells; (v) regulatory T-cells and CD25+ T-cells; (vi) naïve (CD62L) T cells and recent thymic emigrants of CD4/CD8 cells, α/β - and γ/δ -T-cells; (vii) immature, mature, CD56bright, single CD16+ or CD94/NKG2D+ NK-cells; and (viii) Nkp30, 44, 46 and CD57+ NK-cells. Detection of these populations early overcomes putatively normal lymphocyte counts and accelerates diagnosis in immunocompromised patients. Furthermore, this screening panel allows quick detection and differentiation of abnormalities or developmental shifts in subpopulations.

Currently, the rationale behind the treatment of antibody deficiency diseases is to restore physiological levels of serum immunoglobulins by intravenous or subcutaneous substitution, which has been shown to prevent or alleviate infectious episodes. Cellular and combined immunodeficiencies are eligible to stem cell transplantation.

References

Boldt A, Borte S, Fricke S, Kentouche K, Emmrich F, Borte M, Kahlenberg F, Sack U: Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. Cytometry B Clin Cytom 2014.

Borte S, von DU, Fasth A, Wang N, Janzi M, Winiarski J, Sack U, Pan-Hammarstrom Q, Borte M, Hammarstrom L: Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. Blood 2012;119:2552-2555.

Borte S, Lanig H, Borte M, Fasshauer M, Sack U: Therapeutic Implications of the IL-21: IL-4 Receptor System in Children with Common Variable Immunodeficiency Syndrome. Klinische Padiatrie 2010;222:362-367.

DETERMINATION OF IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF PROBIOTIC LCR35 WITH THERAPEUTIC AIM IN THE GYNECOLOGICAL FIELD

[1]BERTRAN T., [1]DOSGILBERT A., [1]VAREILLE-DELABRE M., [1]GARCIN S., [1]BRACHET P., [1]TRIDON A., [1]EVRARD B.

(1)**. Laboratoire d'immunologie, Equipe ECREIN, Unité de Nutrition Humaine, UMR1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.* ***Email: *Thomas.bertran@udamail.fr*

Dendritic cells (DC) are the principal antigen presenting cells (APC) and play a critical role in the orchestration of the adaptive immune response. Immature DC reside in peripheral mucosa and induce lymphocyte effective response or tolerance. They sense the microenvironment *via* pathogens recognition receptors (PRR) like DC-SIGN, whose stimulation leads to DC maturation and migration to the lymph node for antigen presentation to lymphocytes T. Three signals induce lymphocyte activation, proliferation and polarization in different sub-populations of T cells, namely effector (Th1, Th2, and Th17) or tolerogenic T cells (Treg). Bacterial vaginosis is the most common low genital infection among childbearing age women. It is considered as a dysbiosis with the concomitant decrease in commensal flora composed of *lactobacilli* and increase in anaerobic microorganisms among which *Gardnerella vaginalis* would play a key role. Due to 70% of relapses within 12 months after an antibiotic treatment, the use of probiotics has been considered to counteract persistent alteration of the vaginal flora.

Monocyte-derived DC, generated *in vitro* from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), were treated with *G. vaginalis* and the probiotic Lcr35 (inactivated by UV irradiation). Using scanning and transmission electron microscopy, we evaluated DC ability to capture and to uptake both bacteria. Then, we analyzed the DC maturation profile by flow cytometry labeling using markers of immature DC, *i.e.* PRR as DC-SIGN and Mannose Receptor (MR), and markers of mature DC, *i.e.* the costimulatory molecules CD80 and CD86 and the CMH II molecule HLA-DR. When infected with Lcr35, DC showed a dose-dependent maturation from 0.01 to 100 MOI. On the other hand, no dose-dependent maturation was found with *G. vaginalis* concentrations ranging from 0.01 to 100 MOI. To evaluate the second step of the immune response including DC-T cell interaction, we carried out an allogeneic mixed leukocyte reaction (MLR) using DC and PBMC from different donors, thus inducing an alloreactive lymphocyte proliferation. These experiments allowed us to evidence a possible modulation of lymphocyte proliferation by *G. vaginalis* or Lcr35-infected DC. Lcr35-infected DC induced an increase in lymphocyte proliferation in a dose-dependent manner whereas comparatively *G. vaginalis*-infected DC showed no significant effect. To summarize, our data show than DC are able to take up both bacteria. However, despite being internalized, *G. vaginalis* induces no maturation of DC and no subsequent T cell proliferation. By contrast, Lcr35 induces DC maturation followed by T cell proliferation, in a dose-dependent way.
Two questions arise now: has *G. vaginalis* a tolerogenic profile? Could Lcr35 counterbalance this effect by stimulating an effector immune response?

Further investigation should be done to answer these issues, such as studying naïve T cell autologous polarization in Th1, Th2, Th17 and Treg by flow cytometry. Effector T cell predominance will indicate a pro-inflammatory profile of Lcr35 whereas a Treg predominance will indicate a tolerogenic profile of the pathogenic bacteria.

INTERET DES SOURIS HUMANISEES POUR LES ETUDES PRE-CLINIQUES.

Jean-François Mayol,
Transcure bioServices SAS, Archamps (Haute Savoie)

La possibilité de réaliser une xéno-greffe de cellules souches hématopoiétiques humaines à des souris immuno-déficientes a permis de développer un nouveau modèle pour la réalisation d'études pré-cliniques visant à évaluer l'efficacité de candidats médicaments.

Les souris NOG et NSG présentent une forte immunodéficience permettant le développement d'une hématopoïèse d'origine humaine suite à un traitement myéloablatif et la greffe de cellules souches dérivées de sang de cordon. Selon les protocoles utilisés, le niveau de prise de greffe peut être supérieur à 80% et stable dans le temps (plus de six mois). Toutefois, en raison du manque de cross-réactivité de certains facteurs de croissance murins sur les cellules humaines, le profil de différenciation et la fonctionnalité des cellules du système immuno-hématologique de la souris humanisée ne sont pas strictement comparables à ceux du système immuno-hématologique humain. Pourtant, la présence de cellules CD4+ humaines chez ces souris permet de les infecter avec le VIH, et ainsi d'évaluer l'effet de molécules sur la charge virale. Les tissus murins sont, de plus, capables d'accueillir des cellules humaines servant de réservoir pour le virus et des phénomènes de rebond après trithérapie sont visibles de façon comparable à ce qui a pu être observé chez l'homme. La souris humanisée peut être utilisée pour d'autres types d'infections virales ou bactériennes dont la spécificité est limitée aux cellules humaines comme la dengue, l'EBV, le RSV ou la tuberculose.

Des études sur l'inflammation du système gastro-intestinal sont aussi possible, car en réponse à l'administration de DSS dans l'eau de boisson, les cellules effectrices humaines sont capables de migrer dans le colon de la souris et d'y sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-alpha. Ce modèle peut être utilisé pour évaluer l'efficacité d'anticorps thérapeutiques anti-TNA-alpha pour le traitement de pathologies telles que la maladie de Crohn.

Le système immunitaire d'origine humaine n'est que partiellement fonctionnel en raison d'un manque de réactivité croisée des facteurs de croissance et d'interleukines d'origine murine. Plusieurs modèles sont actuellement en cours de développement pour palier à ce déficit et permettre l'observation de réponses immunitaires humorales et cellulaires complètes. Ils reposent sur des nouvelles générations de souris transgéniques, ou sur l'injection de facteurs de croissance spécifiques. Les applications seront alors nombreuses, depuis l'étude de la réponse vaccinale à la modélisation de maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, lupus, diabète…)

En plus du système immunitaire, d'autres tissus pourront être humanisés comme le foie, la peau, les ilots de Langerhans pour développer de nouveaux modèles à moyen terme.

L'utilisation des souris humanisées dans les études pré-cliniques devient de plus en plus importante car elles permettent d'évaluer l'efficacité de candidats médicaments sur des pathologies pour lesquelles il n'existait pas de modèles petits animaux, mais aussi pour mieux évaluer leurs effets sur le sytème immuno-hématologique humain.

COMPANY AND CERTIFICATION

Bruno LE MOINE
*Quality & Regulatory Affairs Director*Horiba ABX; Montpellier

A Certification is a process by which certificates are attributed by a trustful third party and provides evidence that a product, a service an organization is compliant with the requirements of a reference (Standard)
The organization of a company of international dimension involved in medical device manufacturing impose following defined rules

This begins by the will of complying with some rules and duties. This is a voluntary process. However, it entails that the company must comply with the standards related to its activity

In first, ISO 9001:

This international Standard specifies requirements for a quality management system where an organization needs to demonstrate its ability to consistently provide product that meets customer and applicable regulatory requirements, and aims to enhance customer satisfaction through the effective application of the system, including processes for continual improvement of the system and the assurance of conformity to customer and applicable regulatory requirements.

Application: All requirements of this international standard are generic and are intended to be applicable to all organizations, regardless of type, size and product provided.

The second: ISO 13485:

This international Standard specifies requirements for a quality management system where an organization needs to demonstrate its ability to consistently provide Medical device and related services that consistently meet customer requirements and regulatory requirements applicable to Medical Devices and related services.

This international Standard facilitates harmonized medical device regulatory requirement s for Quality Management Systems.

The third: US Quality System Regulation (21 CFR 820)

Current Good Manufacturing Practice (CGMP) requirements are set forth in this Quality System regulation. The requirements in this part govern the methods used in, the facilities and controls used for, the design, manufacture, packaging, labeling, storage, installation and servicing of all finished devices intended for human uses. The requirements in this part are intended to ensure that finished devices will be safe and effective and otherwise in compliance with Federal Food, Drug and Cosmetic Act. (FDA)

In additional, we respect environmental requirements ISO 14001 and Health and security OHASAS 18001

Regulatory way, 98/79/EC Directive is applies for CE Marking

What is an IVD MD?

"Any medical device which is a reagent, reagent product, calibrator, control material, kit, instrument, apparatus, equipment, or system, whether used alone or in combination, intended by the manufacturer to be used in vitro for the examination of specimens, including blood and tissue donations, derived from the human body, solely or principally for the purpose of providing information :

- concerning a physiological or pathological state, or

- concerning a congenital abnormality, or

- to determine the safety and compatibility with potential recipients, or

- to monitor therapeutic measures."

Respect for the 98/79/EC Directive, allows the manufacturer to mark CE the Medical Device.

How a company develops and design Integrated Quality System for the certification

- Read and understand the directive and the applicable standard
- Define the quality policy of the company
- Describe the activities of the company in the quality manual
- Write and implement major process: Management process, implementation process, support process.

Each chapter of the standard are developed according to the need and the requirement.

The quality system is not fixed, It must evolve towards continuous improvement.

Several internal audits are conducted to test the system and put in place corrective and preventive action if non–compliances are established.

External audit and inspection are conducted by certification agency, customer and compliant authority (ANSM, FDA, ANVISA, MOA…).

CYTOMICS FOR CYTOTOXICITY SCREENING

José-Enrique O'Connor, Guadalupe Herrera, Alicia Martínez-Romero, Laura Díaz, Angela Gomes, Francisco Sala-de Oyanguren, Susana Balaguer, Beatriz Jávega and Jesús Tamarit

Laboratory of Cytomics, Mix Research Unit, The University of Valencia and Principe Felipe Research Center, Valencia, SPAIN

The prediction of cytotoxicity is relevant to drug discovery and regulatory toxicology. Pharmaceutical companies require early detection of acute or chronic toxicity of a drug candidate. The recent EU policy for Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals (REACH) implies toxicity assessment for more than 30,000 chemicals.

While acute toxicity of a substance or drug candidate may be detected in vitro, anticipating long-term toxicity is complicated.

To predict acute human toxicity, we have developed miniaturized in vitro cytomic methods based on flow cytometry and High-Content Analysis. To validate their predictivity, IC50 or EC50 in vitro values for a library of test compounds were correlated by cluster analysis and hierarchization with reported in vivo LC50 or LD50 in humans and rat. Most assays have good correlation with in vivo human toxicity and classify compounds better than the Global Harmonization System (GHS) based on in vivo rat toxicity.

For prediction of chronic hepatotoxicity, we have validated two novel cytomic assays of steatosis and cholestasis, the major causes of drug withdrawal. Steatosis is approached by an assay consisting of 24-hour exposure of HepG2 cells to fatty acids in the presence of test compounds.

Cholestasis is predicted from the interference on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes, with a real-time cytomic assay of bile-acid uptake using fluorescent bile-acid derivatives.

Sponsored by EU (LSHB-CT-2004-512051) and MINECO, Spain (BIO2007-65662 and BIO2010-19870)

HIERACHICAL CLUSTERS AS IMMUNOMONITORING TOOLS

Françoise GONDOIS-REY, Samuel GRANJEAUD & Jacques A. NUNES

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) / Institut Paoli-Calmettes, Marseille
jacques.nunes@inserm.fr

Intially used to analyze genome-wide expression patterns, hierarchical clustering (HCL) are now part of the tools to analyze large flow cytometry data sets generated from immunomonitoring platforms. HCL arranges items in a hierarchy with a tree-like structure based on the distance or similarity between them. The graphical representation of the resulting hierarchy is a dendrogram, usually connected to heat map visualizations. Normalized expression files can be analyzed using TIGR Multi-experiment Viewer (TMeV).

We used this approach to analyze cell signaling events to primary cancer cells (Firaguay G and Nunès JA. Science Signaling 2009) and to explore functional responses from immune cells (Gondois-Rey F et al. Cytometry A 2012). These usefull aspects will be presented. Moreover, cluster analysis should not be only restricted to analyze data files, but these bioinformatic tools will be also important to develop automated gating of flow cytometry data.

References

*Firaguay, G, and **JA Nunès**. Analysis of signaling events by dynamic phosphoflow cytometry. 2009. Sci Signal 2:pl3.*

***Gondois-Rey F**, **Granjeaud S**, Kieu Sle T, Herrera D, Hirsch I, Olive D. Multiparametric cytometry for exploration of complex cellular dynamics. 2012. Cytometry A. 81(4):332-42.*

PROFIL DES CELLULES SOUCHES CD34+CD38+ DANS LE DIAGNOSTIC ET SUIVI DE LEUCEMOIES AIGUES MYELOBLASTIQUES

Adriana PLESA
Laboratoire Hématologie Lyon Lyon Sud

L'origine de la cellule souche leucémique (LSC) est encore controversée dans les LAM. Les LSC sont les cellules initiatrices des leucémies (LIC) responsables de la chimiorésistance et de la rechute, avec une faible fréquence au sein de la population blastique majoritaire. Globalement, J. Dick continue de plaider pour l'organisation hiérarchique de l'hématopoïèse leucémique proche de celle de l'hématopoïèse normale, avec une hétérogénéité du « pool » de LSC et l'émergence au fil du temps des clones initialement minoritaires au diagnostic. Très récemment une étude réalisée par la même équipe a démontré l'existence de cellules souches hématopoïétiques (HSC) « pré-leucémiques » ou « ancestrales » dans les LAM porteuses de la mutation DMT3A sans mutation NPM1c. L'hétérogénéité au sein de la population leucémique a était démontrée par l'équipe de N Goardon avec la co-existence des LSC dans le compartiment de progeniteurs plus matures (*GMP-like=granulocyte-macrophage progeniteurs et LMPP-like=lymphoid-primed multipotential progeniteurs)*, avec l'implication directe dans l'évaluation de MRD (décrite récemment par G.J.Schuurhuis comme « moving target »). Malgré ces controverses, les LSC des patients atteints de LAM CD34+ apparaissent plus fréquentes dans le compartiment de blastes de phénotype CD34+ CD38- (probablement le « réservoir » de cellules leucémiques).

Le profil immunophénotypique des cellules souches repose sur une combinaison multiparamétrique associant CD34/CD38/CD45 (profil « backbone ») permettant de mettre en évidence la maturation de cellules initialement CD34+/CD38- qui deviennent CD34+/CD38+ et au final CD34-/CD38+, en utilisant aussi des combinaisons avec d'autres marqueurs (CD13, CD33, CD7, CD19, CD15, CD117), ainsi que des marqueurs d'intérêt potentiel comme cible thérapeutique (CD123, CXCR4, CD47, CD44, CD49f, VLA4, TIM3). Cette combinaison multicouleurs (FACS Canto II, BD Bioscience), permet aussi de caractériser plus précisément la population blastique et d'identifier des sous-clones leucémiques. Nous avons observé sur une série de 200 patients de LAM de notre centre de Lyon une forte hétérogénéité dans l'expression de CD34 vs CD38 qui confirme les données de la littérature et montre la valeur pronostique du taux de blastes au profil « souches » CD34+CD38-, les patients avec un taux de CD34+CD38- >1% au diagnostic ayant une diminution significative de la survie et de la survie sans maladie. De même, nous avons montré récemment dans une étude portant sur 123 patients atteints de LAM qui ont reçu des autogreffes de CSH de cytaphérèses, l'impact pronostique sur la survie globale et survie sans maladie du % de cellules CD34+CD38-, ce qui suggère que le compartiment CD34+CD38- est plus enrichi en LSC responsables de rechute.

Au vu de ces données récentes, il semble donc important d'intégrer dans la pratique de routine, cette stratégie d'identification, quantification et caractérisation des blastes de LAM au profil « cellules souches » CD34+CD38-, permettant d'une part le développement des stratégies thérapeutiques de plus en plus ciblées, et d'autre part étudier la MRD type « cellules souches » comme outil complémentaire à la MRD « LAIP » classique et la MRD moléculaire dans les prochains protocoles thérapeutiques.

Bibliographie :

1) *L.I. Shlush, J.E.Dick, et al : Identification of pre-leukemic hematopoietic stem cells in acute leukaemia, Nature, 12 Febr 2014 ;*
2) *N.Goardon, P.Vyas, et al : Coexistence of LMPP-like and GMP-like Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia, Cancer Cell,18 Jan 2011 ;*
3) *W.Zeijlemaker, J.W.Gratama, G.J.Schuurhuis : Tumor Heterogeneity Makes AML a « Moving Target » for Detection of Residual Disease, Cytometry PartB, 17 Sept 2013.*

ANALYSIS OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA BY MULTIPARAMETER FLOW CYTOMETRY

I. Arnoux, M. Loosveld, V. Nivaggioni, Chantal Fossat,

Hematology Laboratory, Hôpital de la Timone, Marseille, France

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a clonal proliferation of lymphoid cells engaged in B- or T-lineage differentiation and blocked at an early maturation stage. These cells display immunophenotypic features enabling the identification of cell lineage and stage of arrest, in some cases with aberrant expression of markers from other lineages.

Approximately two thirds of ALL cases occur in children or adolescents, making this disease one of the most common cancers in this age group. Constant progress in the clinical management of these patients has resulted in a cure rate of about 80% in children. These good results are obtained after carefully assessing individual risk factors, in order to select the most appropriate therapy providing the optimal balance between toxicity and cure.

The detection of persistent minimal residual disease (MRD) after the induction phase in patients in complete remission has become a decisional issue. Such approach is feasible both by molecular assessment and multiparameter flow cytometry (MFC).

The challenge of cytometric MRD detection in ALL is to detect abnormal cells in the small populations of maturing lymphoid cells in the peripheral blood (PB) or bone marrow (BM), and it can be evaluated with different approaches: 1) detection of patterns at variance with those expressed by normal BM cells, 2) systematic analysis with a standard restricted panel of markers and 3) assessment at diagnosis of leukemia associated immunophenotypic patterns (LAIPs); these are later searched for in identifying remaining blast cells among regenerating normal BM cells. The approach based on detection of LAIPs, in patients with de novo ALL, is performed on. fresh PB or BM cells collected on EDTA and forwarded to the flow cytometry laboratory at diagnosis, and during the follow up. After adjustment of the sample, and according to the patient's characteristics at diagnosis, the maximal possible of relevant MRD markers are processed, using $5x10^5$ to $1x10^6$ cells for each combination, in order to reach the goal of a 10^{-4} threshold also.

Monoclonal antibodies are mixed extemporaneously, cells are added, thoroughly vortexed, incubated in the dark at room temperature. Analysis by flow cytometry is then performed immediately. Data collection are performed on at least 10^5 cells (debris excluded), allowing the detection of at least 10 cells clusters (which define a positive MRD), to be identified in all plots of interest and carrying at least two LAIP markers identified at diagnosis. In case of discrepant results between antibody combinations, the highest MRD value derived from the most informative monoclonal antibody combinations, i.e. those that most clearly resolved the abnormal blasts from normal cells, is selected as proposed in the literature.

As previously published, an aberrant immunophenotype is observed in 97% of B- or T-ALL cases at diagnosis. LAIP markers are considered applicable for the detection of MRD, when they are widely and homogenously expressed by at least 90% of the malignant cells at diagnosis and not by normal cells.

We will discuss the most commonly identified LAIPs, in comparison to normal B-or T-cell progenitor markers, including CD38+dim, CD58+bright , CD123+bright, CD24+dim, TdT+, CD99+bright, CD1a+, CD10+ and CD34+, in addition CD10+/CD19+/CD45+ or CD3+/cCD3+/CD5+ backbone, the gating strategies, the potential weakness of the method.

Training and education are needed to better appreciate relevant LAIPs. The causes of MRD discordance include inappropriate gating, poorly discriminant LAIP, unrecognized subsets of leukemic cells with a distinct LAIP or insufficient material for complete immunophenotype.

MFC-MRD assessment provides in ALL rapid results with adequate sensitivity. Ongoing developments address the requirements associated with rigorous harmonization. MRD data at a sensitivity of 10^{-4}, with quantitative MFC method provide clinically relevant informations at early time of treatment, especially for positive patients who may rapidly be reoriented to an appropriate management. For low MRD levels, the identification of truly low-risk patients can be more difficult to achieve and must be done very cautiously. We expect that future technical progress, focusing on more specific discrimination of ALL cells from normal B-cell precursors, will be facilitated by new markers and combined immunostainings, and assisted by increased instrumental capability in multiparameter analysis.

Literature

Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui C-H, Downing JR, Campana D. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2011;117:6267-6276.

Denys B, van der Sluijs-Gelling AJ, Homburg C, van der Schoot CE, de Haas V, Philippé J, Pieters R, van Dongen JJM, van der Velden VHJ. Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2013;27:635-641.

Fossat C, Roussel M, Arnoux I, Asnafi V, Brouzes C, Garnache-Ottou F, Jacob MC, Kuhlein E, MacIntyre-Davi E, Plesa A, Robillard N, Tkaczuk J, Ifrah N, Dombret H, Béné MC, Baruchel A, Garand R, for the French Multicenter Study Groups for Pediatric and Adult ALL. Methodological Aspects of Minimal Residual Disease Assessment by Flow Cytometry in Acute Lymphoblastic Leukemia: A French Multicenter Study on Behalf of the GEIL, GRAALL, FRALLE and EORTC. Submitted to Cytometry Part B.

Garand R, Beldjord K, Cavé H, Fossat C, Arnoux I, Asnafi V, Bertrand Y, Boulland ML, Brouzes C, Clappier E, Delabesse E, Fest T, Garnache-Ottou F, Huguet F, Jacob MC, Kuhlein E, Marty-Grès S, Plesa A, Robillard N, Roussel M, Tkaczuk J, Dombret H, Macintyre E, Ifrah N, Béné MC, Baruchel A. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. Leukemia 2013;27:370-376.

Hedley, B. D. and Keeney, M., Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. International Journal of Laboratory Hematology 2013;35: 344–350

Robillard N, Cave H, Mechinaud F, Guidal C, Garnache-Ottou F, Rohrlich PS, Avet-Loiseau H, Garand R. Four-color flow cytometry bypasses limitations of IG/TCR polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in certain subsets of children with acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2005;90:1516-23.

L'ETUDE DE LA MALADIE RESIDUELLE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DANS LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE (LLC), APPROCHES TECHNIQUES CLASSIQUES ET NOUVEAUX DEVELOPPEMENTS.

Rémi Letestu,

Laboratoire d'hématologie, Hôpital Avicenne AP-HP, Bobigny

La LLC est un syndrome lymphoprolifératif B chronique fréquent qui touche l'adulte de plus de 75 ans dans 45% des cas. Le diagnostic de cette hémopathie repose sur l'identification immunophénotypique d'un profil de marqueurs caractéristiques (Matutes 1994, Moreau 1997, Hallek 2008). L'évolution clinique est variable d'un sujet à un autre, les patients éligibles présentant une maladie progressive sont traités par immunochimiothérapie, cependant, une véritable guérison ne semble être obtenue que chez les sujets pouvant bénéficier d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Enfin, les sujets dont l'état général ne permet pas l'instauration d'un traitement intensif peuvent bénéficier d'un traitement ne visant que le contrôle de la maladie.

En 2008, l'iwCLL a révisé les critères diagnostiques, les indications thérapeutiques et les critères de réponse au traitement (Hallek 2008) avec l'émergence des notions de MBL, de traitement de la maladie progressive (quel que soit son stade clinico-biologique) ou encore l'utilisation de nouveaux critères de réponse et l'étude de la maladie résiduelle en perspective dans les essais cliniques. Par la suite, des études ont montré l'intérêt de l'analyse du statut de la maladie résiduelle après traitement et de son impact sur la survie sans progression et la survie globale (Böttcher 2012).

D'un point de vue technique, la MRD peut être étudiée de différentes façons en faisant appel à des méthodes de biologie moléculaire ou de cytométrie en flux. Dans cette présentation, seules les techniques de cytométrie en flux seront évoquées du fait du choix de cette option dans la plupart des essais thérapeutiques jusqu'à présent. On distingue les approches de faible sensibilité qui mettent en œuvre des techniques simples de marquages en 2 à 4 couleurs avec étude de l'expression des chaînes légères de membrane et les procédures plus sensibles. Ces dernières font appel à des combinaisons de 4 à 6 marqueurs et sont plus ou moins standardisées, enfin, plus récemment avec les progrès des matériels, des approches en 8 couleurs et plus ont été développées.

Dans le cadre des dernières avancées technologiques, la robustesse des résultats obtenus a été renforcée du fait de la haute spécificité des combinaisons multicouleur. Dans le même temps, de nouvelles questions ont découlé de ces progrès et de nouveaux challenges se sont présentés conduisant, pour y répondre, à de nouvelles approches techniques et analytiques. Dans cette présentation, ces nouveaux développements seront illustrés à travers l'utilisation du principe d'acquisition conditionné sur la fluorescence pour le versant technique et, pour le versant analytique, l'utilisation d'une stratégie de traitement de données originale faisant appel à des populations cellulaires contrôles internes.

LEUCEMIE A GRANDS LYMPHOCYTES GRANULEUX T CD4, A PROPOS D'UN CAS.

Ghazi M*, Lleres M*, Rigall J*, Solly F.

*Contribution équivalente

Laboratoire d'hématologie, CHU de Saint-Etienne.

Nous rapportons le cas d'une leucémie à grands lymphocytes granuleux (LGL) T CD4, original par sa présentation clinico-biologique plutôt sévère et son association à syndrome myéloprolifératif JAK2+. La littérature, peu prolixe au sujet des expansions clonales de LGL CD4, sera discutée.
Il s'agit d'une patiente de 55 ans suivie pour un syndrome myéloprolifératif (SMP) JAK2+ depuis 2003 à l'Institut de Cancérologie de la Loire. Le traitement de ce SMP par hydroxyurée est marqué par la survenue de plusieurs épisodes de pancytopénie.

Fin Août 2013, la numération formule sanguine montre une anémie arégénérative à 9.5 g/dL, une thrombopénie à 51 G/L et une neutropénie à 0.6 G/L, sans hyperlymphocytose. Sur le frottis, la population majoritaire correspond à des lymphocytes à grains, aux contours nucléaires le plus souvent réguliers, au cytoplasme volontiers peu abondant et dans lequel les granulations azurophiles sont soit de grande taille, soit plus rarement peu visibles.

Le myélogramme évoque une aplasie médullaire en décrivant une moelle pauvre en dépit de la présence de quelques grains réticulo-médullaires, dans lesquels les cellules myéloïdes sont très rares. Les trois quarts des lymphocytes observés sont des lymphocytes à grains.
Une biopsie ostéo-médullaire réalisée en septembre 2013 ne révèle pas de signes de thrombocytémie essentielle ou de myélofibrose, et retient une insuffisance médullaire quantitative associée à une insuffisance médullaire qualitative portant surtout sur les lignées mégacaryocytaire et érythroblastique. Une lymphocytose interstitielle et nodulaire est également notée, qui semble majoritairement constituée de cellules co-exprimant les antigènes CD4, CD56 et TIA-1.

Les cultures cellulaires montrent un nombre de progéniteurs érythroblastiques et granulo-monocytaires diminué. Il n'est pas observé pas de pousse endogène des progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires.
L'immunophénotypage par cytométrie en flux identifie dans la fenêtre d'analyse correspondant à la population lymphocytaire, une majorité de lymphocytes T exprimant les antigènes pan-T CD2, CD3 et CD5, mais seulement partiellement l'antigène CD7 (trou CD7), exprimant l'antigène CD4 en l'absence de CD8, et un TCR de type alpha-béta avec un répertoire restreint. Ces cellules expriment également les marqueurs de cytotoxicité CD56 et CD57, la protéine TIA-1 en intra-cytoplasmique, et possèdent l'équipement enzymatique perforine/ granzyme B. On retient donc un phénotype de LGL CD4+, qui représentent environ 40% des lymphocytes médullaires et sanguins, soit 0.8 G/L dans le sang.
La détection d'un réarrangement clonal du TCRgamma par technique de biologie moléculaire (amorces BIOMED 2) démontre le caractère clonal de ces LGL. Le caryotype n'apporte pas d'argument diagnostique supplémentaire.

Parallèlement, la quantification du transcrit JAK2 montre une diminution du ratio allélique JAK2 V617F/JAK 2 WT à 0.52% (23% en 2011).
En Avril 2014, l'expansion persistante de LGL CD4 est confirmée au niveau périphérique et médullaire, estimée actuellement à 1.3 G/L.

Au total, le diagnostic retenu est celui d'une aplasie médullaire associée à une expansion clonale de LGL CD4. Un traitement immunosuppresseur par cyclosporine a été instauré fin 2013 mais mal supporté notamment sur le plan digestif. Au niveau hématologique, une transfusion hebdomadaire de culots globulaires et des transfusions de plaquettes sont nécessaires. Une allogreffe de moelle osseuse non apparentée est réalisée le 23 avril 2014 après un conditionnement par chimiothérapie.

FLOW CYTOMETRY IN THE DIAGNOSIS OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Carmen Mariana Aanei[1, 2], Micha Srour[1, 3], Emmanuelle Tavernier[1, 3], Christian Vasselon[1, 2], Steeve Chevreux[4], Denis Guyotat[1, 3], Lydia Campos Catafal[1, 2]

[1]*CNRS UMR5239, Université de Lyon, 42023, Saint-Etienne,*
[2]*Laboratoire d'Hématologie, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne,*
[3]*Department of Hematology, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, 42070 Saint Priest en Jarez,*
[4]*Faculté de médecine Jacques Lisfranc, Université Jean Monnet, Saint-Etienne*

The myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal disorders of haematopoiesis, heterogeneous as clinical presentation and morphologic findings that make diagnosis often difficult, especially in the early stages. Recently, refined definitions and standards in the diagnosis and treatment of MDS are proposed, but a lot of questions are open.
Concerning the diagnostic, various scores have proposed, but none achieved the sensitivity required for reassuring diagnosis in the absence of morphological abnormalities. One supposed reason could be the fact that each of them evaluates one or two lineages without being able to offer a broad view of the dysplastic process. Combinations of two scores (i.e., Ogata and Red Score) have improved the sensitivity from 50-60% to 88%, but the negative predictive values still remains to be improved. Likewise, there are prominent differences between study groups when these scores are tested.
Possible differences could be assigned to antibodies clones used for staining; antibodies combinations, selection of fluorochromes, antibodies stabilities, analysis strategy, etc. Moreover, despite that in the last years some drugs have been developed, the parameters which could predict the treatment response has not been established yet.

Herein, we have tested the Kern score on 114 cases of cytopenias of different origins, including refractory cytopenias, anemias related to chronic renal failure or with inflammatory diseases, aplastic anemias, myeloproliferative diseases, MDS/MPN syndromes, autoimmune diseases (as Idiopathic Thrombocytopenic Purpura), acquired hemoglobin H diseases, anemias due to vitamin deficiency or toxic exposure, cytopenias secondary to lymphoproliferative diseases using the Euroflow MDS/LAM panel.

The results show differences compared with those published by Kern's side and try to give answers to this. Likewise, we developed a prognostic score which could predict the patient's response to 5-azacytidine treatment.

Further research is needed to maximize the sensitivity of flow-cytometry analysis in MDS.

COMMENT BIEN COMPTER DES EVENEMENTS RARES ?

Bernard CHATELAIN

CHU Mont Godinne Belgique

IMMUNO-MONITORAGE DES CELLULES NK DE PATIENTS ATTEINTS DE MYELOME ET TRAITES PAR LENALIDOMIDE.

S Viel[1,2,3], E Charrier[1], P Rouzaire[1,2,3], L Karlin[4], G Salles[4], J Bienvenu[1,2,3] et T Walzer[2,3]

[1]*Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, 69310 Pierre-Bénite,*
[2]*Université Claude Bernard Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France*
[3]*Centre International de Recherche en Infectiologie, CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, UCBL1, 69007 Lyon, France*
[4]*Service d'Hématologie, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, 69310 Pierre-Bénite,*

Introduction : Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules lymphoïdes innées reclassifiées récemment comme appartenant au 1er groupe des « Innate Lymphoid Cells » (ILC1). Ces cellules sont définies par leur capacité à éliminer des cellules identifiées comme cibles (cellules cancéreuses ou infectées par des pathogènes intracellulaires) après leur reconnaissance par un panel de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Une fois activées, les cellules NK peuvent exercer leurs fonctions effectrices qui sont la cytotoxicité (et donc l'élimination de la cellule cible) et la sécrétion de cytokines comme l'Interféron γ (IFN-γ). Du fait de leurs propriétés anti tumorales, ces cellules ont été étudiées dans le cancer et il a déjà été montré que le compartiment cellulaire NK était altéré chez des patients atteints de certaines hémopathies comme le myélome multiple (MM).

L'objectif de cette étude est d'analyser sur un plan phénotypique et fonctionnel les cellules NK de patients atteints de différentes gammapathies monoclonales et de suivre, dans le temps, l'effet du lénalidomide, médicament immunomodulateur connu pour activer les cellules NK *in vitro*, sur les cellules NK circulantes.

Matériel et méthodes : 42 patients atteints de gammapathies monoclonales ont été inclus (17 gammapathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS), 11 MM asymptomatiques et 14 MM symptomatiques) ainsi que 11 patients atteints de myélome en rémission, traités par lénalidomide seul, et suivis tous les mois pendant un an. A partir de sang total, les cellules NK ont été analysées par cytométrie en flux et l'expression de différents marqueurs (récepteurs activateurs, récepteurs inhibiteurs, marqueurs d'activation, molécules associées à la cytotoxicité) a été mesurée. A partir du même échantillon de sang, les cellules mononuclées ont été isolées par Ficoll et mises en co-culture pendant 4h (ratio 1/1) avec des cellules K562 connues pour être des cibles des cellules NK *in vitro*. A la fin de l'incubation, le pourcentage de cellules NK positives pour le marqueur de cytotoxicité CD107a ainsi que pour la cytokine IFN-γ a été déterminé par cytométrie en flux.

Résultats : Les cellules NK des patients atteints de gammapathies monoclonales ont un profil de cellules activées (augmentation de l'expression de CD69 et de NKG2C). De plus, elles expriment plus faiblement certains récepteurs activateurs comme NKp30 ainsi que la perforine. Ces anomalies phénotypiques s'accompagnent d'une diminution de leurs capacités fonctionnelles (cytotoxicité et production de cytokines) en réponse à une stimulation par les cellules K562.

Concernant les patients traités par lénalidomide, il semble que le traitement du myélome corrige les défauts fonctionnels observés au diagnostic ainsi que d'autres anomalies phénotypiques comme la diminution de l'expression de NKp30. De plus, nous observons qu'au cours du traitement l'expression d'autres paramètres comme CD57 (marqueur de maturation) ou CD94 tendent à se normaliser.

Discussion/Conclusion : Au cours de ce travail, nous avons confirmé, sur notre cohorte, que les cellules NK de patients atteints de gammapathies monoclonales présentent des défauts de leurs fonctions effectrices. Nous avons également observé que le traitement du myélome restaure en partie ces défauts et que, même si le lénalidomide semble moduler l'expression de certains marqueurs, il n'active pas de façon évidente les cellules NK des patients traités.

PLACE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC DES THROMBOPENIES INDUITES PAR L'HEPARINE (TIH)

Aurélie MONMARTIN, Brigitte TARDY
Laboratoire Hémostase, Groupe de Recherche sur la Thrombose, EA 3065, CHU Saint-Etienne

La thrombopénie induite par l'héparine (TIH) est une complication sévère des traitements à l'héparine qui peut être associée à des thromboses veineuses ou artérielles. La TIH est une réponse immunitaire liée à la production d'anticorps (AC) dirigés contre un complexe associant l'héparine à une protéine plaquettaire : le facteur 4. Ces AC peuvent induire l'activation des plaquettes qui conduit elle-même à l'agrégation plaquettaire, et à la production et libération de microparticules pro coagulante. Ces AC peuvent aussi activer les monocytes et les cellules endothéliales et leur faire exprimer du facteur tissulaire. Cette activation pluricellulaire aboutit à la génération de thrombine (Mullier F et al. 2013). Le diagnostic est évoqué sur des critères cliniques et biologiques ainsi que sur leur chronologie par rapport à l'introduction du traitement. Le diagnostic nécessite cependant une confirmation biologique qui repose sur la mise en évidence des AC héparine dépendants. La mise en évidence de ces AC fait appel à deux types de test : les tests fonctionnels (Test d'agrégation plaquettaire et test de libération de la Sérotonine marquée(SRA)) et les tests ELISA.

Le test SRA a une bonne sensibilité et une bonne spécificité, il est pour la mise en évidence des AC anti H-PF4 de nature IG G et est considéré comme la technique de référence. Ce test a l'inconvénient d'être de réalisation longue et délicate (ne peut donc être réalisé au coup par coup mais plutôt en série). Par ailleurs il nécessite l'utilisation de produits radioactifs ce qui rend son utilisation non possible par tous les laboratoires. Le test d'agrégation plaquettaire très répandu dans les laboratoires d'hémostase est considéré comme moins sensible et consommateur de plaquettes et de plasma. Plus récemment un autre test fonctionnel a été proposé par Aaron Tomer. Il utilise la cytométrie en flux pour mettre en évidence une activation plaquettaire induite par l'AC héparine dépendant.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la performance de ce test fonctionnel de cytométrie en flux (CMF). Pour réaliser cette étude, 114 plasmas de patients, issus d'une étude multicentrique « TIH score » ont été sélectionnés par tirage au sort dont 41 avec un diagnostic de TIH positif et 73 avec un diagnostic de TIH négatif. Les résultats de cytométrie en flux ont été comparés au diagnostic de TIH posé par les experts sur la base des données cliniques et biologiques ainsi que sur les résultats des tests réalisés au sein de chaque laboratoire (Agrégation et ELISA).

Conformément au test CMF, décrit par Aaron Tomer, la technique se déroule en deux étapes : premièrement 10 µL de plasma contrôle riche en plaquettes fraîches sont incubées avec 10 µL de plasma de patient en présence (0.3 ou 100 UI/mL) ou absence d'héparine (PBS). Dans un second temps, chaque échantillon est incubé avec un mix d'anticorps contenant un marqueur plaquettaire CD41 couplé au fluorochrome PE et un marqueur d'activation plaquettaire CD62p couplé au fluorochrome FITC. L'acquisition des plaquettes en suspension est réalisé sur un cytomètre en flux deux couleurs BD Accuri C6 et le pourcentage de plaquette activée est analysé avec ou sans héparine. Un plasma est considéré comme positif pour l'AC s'il induit une activation plaquettaire en présence d'une faible concentration d'héparine mais pas d'une forte concentration. Les résultats donnent une sensibilité et spécificité qui sont respectivement de 100% et de 79% pour la CMF. La sensibilité et la spécificité de la SRA sur les mêmes plasmas sont respectivement de 90% et 86%. L'avantage de la CMF sur la sérotonine est qu'elle est plus rapide et plus facile et qu'elle nécessite des quantités moindres de plasma et de plaquettes.

En conclusion, la CMF donne des résultats similaires à la SRA dans le diagnostic de la TIH. Si on prend en compte les avantages potentiels de cette méthode, le test de cytométrie en flux semble représenter une technique prometteuse pour une pratique en routine.

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF VASP PHOSPHORYLATION FOR THE DETECTION OF CLOPIDOGREL RESISTANCE

Caroline PEILLON[1], Loïc BELLE[2]

1- Laboratoire hématologie, 2- service de cardiologie
Centre hospitalier Annecy Genevois, 1 avenue de l'hôpital Metz Tessy, BP 90074 Pringy Cedex
cpeillon@ch-annecygenevois.fr

Dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel (thienopyrindine, specific platelet adenosine diphosphate ADP antagonists) has been the cornerstone in the management of coronary artery disease for patients undergoing Percutaneous Coronary Intervention (PCI) with clear benefits in the prevention of stent thrombosis following stent (80% decrease of acute stent thrombosis). However, not all patients benefit to the same extent from these improvements in platelet therapy, and some continue to suffer ischemic recurrences (10% of patients suffer recurrent thrombotic event in the year following anti platelet therapy) , including stent thrombosis (1% of patients).

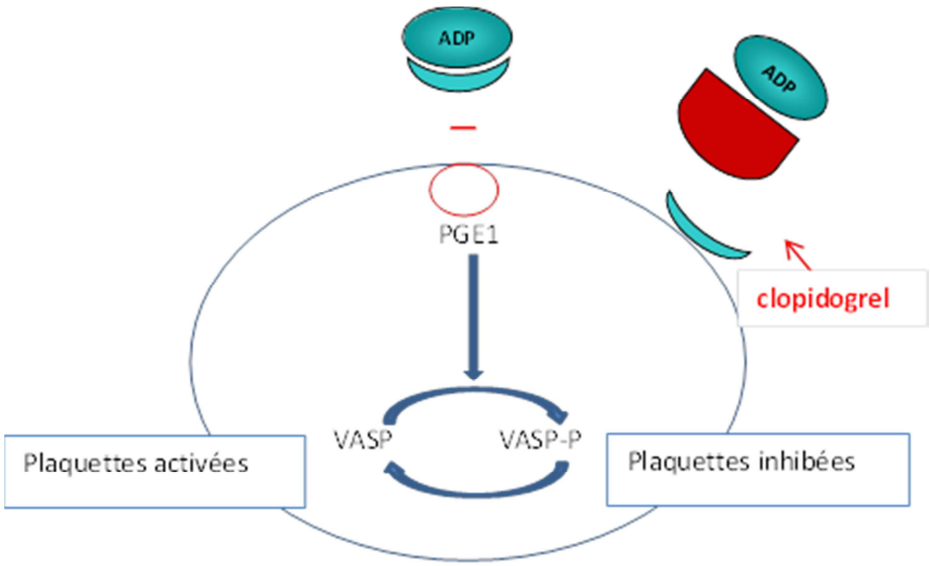
In vitro tests of platelet reactivity, such as vasodilatator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation analysis, accurately detect biological clopidogrel resistance, wich (is) associated with worse outcome after PCI.

PLT VASP/P2Y12 kit assay [Diagnostica Stago /Biocytex] is dedicated to monitoring of specific platelet ADP receptor antagonists as clopidogrel and uses a standardized flow cytometric . The aim of the test is to measure the VASP phophorylated, labeled with a monoclonal antibody. The persistence of VASP phosphorylated induced by prostaglandin E1 in spite addition ADP, reflects the effects of the clopidogrel. A platelet reactivity index (PRI) is calculated from median fluorescence intensity (MFI) of samples. The VASP test has a good specificity and has a strong correlation with ADP-induced platelet aggregometry, which is considered the gold standard.

The Vasp Index or PRI is about 78.3% $\pm$4.6 in healthy donors and a cutoff value of 50% of PRI is predictive of major adverse cardiac events. The VASP index is inversely correlated with clopidogrel efficiency. There is a wide inter-individual variability of the efficacy of clopidogrel treatment. In the patients who received clopidogrel, the PRI values are widely dispersed (from 6.6% to 85%) and more than 30% of these patients had a PRI in the same range as patients who were not receiving clopidogrel. So with the flow cytometric analysis of VASP, one-third of the patients treated appears to be « unprotected » by this therapy.

Adjusting the clopidogrel loading dose according to VASP index among patients with clopidogrel resistance who were undergoing coronary stenting may significantly improve clinical outcome. A first bolus of clopidogrel was given to patients undergoing PCI for refractory angina pectoris under optimal therapy, silent ischemia, or non-ST-segment elevation myocardial

infarction. The VASP was measured 24h after the bolus and the overall dose of clopidogrel was adjusted individually, before PCI, to obtain a VASP index below 50%. Despite increasing doses of clopidogrel, about 15% of patients remained resistant with a PRI VASP >50%.



NON-CONVENTIONAL CD4+ CD8+ MATURE T-CELLS

Marie-Christine JACOB.
Department of Immunology. CHU Grenoble. France

Double positive (DP) CD4+CD8+ T-cells are almost always observed during routine analysis of blood and tissue samples. They usually do not exceed 3% of total lymphocytes in healthy individuals, but expansions are commonly detected, with a trend to be more frequent in elderly (Ghia 2007). Expansions are also identified in various pathologic conditions such as infections with persistent viruses (CMV, HIV, HCV, EBV…), autoimmunity (multiple sclerosis, thyroiditis, Kawasaki, idiopathic thrombopenia…), cancer (breast cancer, melanoma, Hodgkin disease, myeloma…) and post-transplant (kidney, haematopoietic stem cells…) (Parel 2004). They can reach 40% (Kay 1990; Sala 1993), and in rare cases more than 70% (Tonutti 1994; Colombatti 1998). Apart from these reactive subsets, CD4+CD8+ may be also of tumour origin (Mizuki 1998). In all cases DP T-cells express the αβ TCR.

On the basis of CD4 and CD8 intensity, mature DP T-cells can be subdivided into $CD4^{high}$ $CD8^{low}$, $CD4^{low}$ $CD8^{high}$ and $CD4^{high}$ $CD8^{high}$ positive cells. Of note, CD8 molecules consist in αα homodimers when the expression is low and αβ heterodimers when it is high. Reports about DP T-cell are numerous from 1983 to 2013, but unfortunately, information about this phenotypic characteristic is often lacking.

Several investigations aimed at regarding clonality of reactive CD4+CD8+ expansions. Whatever the technique (TCR Vβ repertoire by flow cytometry, southern blot, PCR or CDR3 spectratyping), DP T-cells revealed to be either plolyclonal, oligoclonal or even monoclonal (10% of healthy individuals, Ghia 2007).

In the acute phase of viral diseases due to EBV (Ortolani, 1993) or HIV (Frahm, 2012) infections, CD4+ CD8+ T-cells were transient. They consisted in naive or central memory activated lymphocytes. In contrast, DP T-cells were stable over 3 years or longer (Ortolani 1993; Tonutti 1994; Weiss 1998) in healthy donors and in chronic pathologies. In most cases, they expressed a phenotype of terminally differentiated memory lymphocytes without activation markers (CD56+ CD57+ CD28- CCD27- CCR7-, short telomeres and low TREC content) (Suni 2001; Nascimbeni 2004; Ghia 2007). They revealed LGL morphology and low expression of CD8. (Richards 1992; Sala 1993; Tonutti 1994). In contrast, $CD8^{high}$ T-cells were memory CD57- CD56- and CCR7±, with morphology of small lymphocytes (Tonitti 1994; Desfrançois 2009; Zloza 2009).

As largely established in several models of either infectious or cancer disorders, DP T-cells were greatly enriched in specific cells with more potent capacity of antigen recognition than single positive T-cells (Suni 2001; Nascimbeni 2004; Kitchen 2002-2004; Zloza 2009-2010). As regards their functions, cytotoxic potential (perforin+, granzyme+, expression of CD107a upon stimulation) (Nasimbeni 2004; Zloza 2009), but also actual cytolytic activity on virus infected or tumour cells (Bagot 1998; Suni 2001; Desfrançois 2010) were also largely demonstrated. In addition, DP T-cells revealed to secrete high levels of cytokines of Th1 (IFNγ, TNFα) and/or Th2 (IL4, IL5, IL13) type (Zloza 2003; Nascimbeni 2004; Parel 2007; Desfrançois 2010). Interestingly, it appeared that DP T-cells were bifunctional with helper and cytotoxic capacities

in most instances. Two authors focused on such properties and demonstrated that DP T-cells were not only multifunctional, but also displayed most of these specific immune activities (Zloza 2009; Frahm 2012). This concerned $CD4^{high}$ $CD8^{low}$ as well as $CD4^{low}$ $CD8^{high}$ and $CD4^{high}$ $CD8^{high}$ lymphocytes.

The in vivo role of DP T-cells remains to be determined. Since they increase upon stimulation during acute viral infection or after vaccination and demonstrated high functionality, they are considered to contribute to the adaptive immune response. In the acute phase of HIV infection they have been associated to lower viral load and disease control (Frahm 2012). In contrast, DP T-cell expansions were correlated to unfavourable events in breast cancer (Desfrançois 2009), Kawasaki (Hirao 1998) and ITP (Scott 1983). Of note, they were also present in the target organs of several autoimmune diseases (De Maria 1987; Parel 2007; Iwatani 1993; Bang 2001), suggesting their involvement in pathogenically relevant events.

It is nowadays well admitted that most DP T-cells arise from mature SP T-cells that acquired the other co-receptor in response to stimuli received during productive immune responses (Parel 2004). Indeed, CD8αα can be induced on purified CD4+ T-cells in culture with IL4. This expression is stable and endows the cells with cytolytic capacity (Blue 1986; Paliard 1988; Lusso 1991; Hori 1991). $CD4^{high}$ $CD8^{low}$ disclosed a phenotype of effector memory T-cells and closely resembled single positive CD4 T-cells as regards their repertoire or antigenic expression (Weiss 1998; Colombatti 1998; Suni 2001; Frahm 2012). Accordingly, it can be tentatively concluded that they represent a subset of terminally differentiated effector CD4+ T-cells. Otherwise, CD8ß T-cells may acquire low levels of CD4 in vitro via TCR cross-linking (Flamand 1998; Kitchen 1998-2002-2004; Zloza 2010) or stimulation with HHV6 (Lusso 1991). It is thus suggested that up regulation of CD4 on CD8 T-cells is a normal reaction to T-cell activation. CD4 expression on CD8 T-cells enhanced their immune responses, influenced their trafficking in presence of IL16 and rendered them sensitive to HIV infection. They are considered as highly active effector cells. Finally, it is hypothesised that $CD4^{high}$ $CD8^{high}$ T-cells could represent autoreactive T-cells that have escaped thymus selection (Parel 2004), regarding their high frequency in autoimmune diseases.

HEMOPHAGOCYTOSE LYMPHO-HISTYOCYTAIRE ET SYNDROME D'ACTIVATION MACROPHAGIQUE

M N Kolopp-Sarda[1], C Malcus[2]

Laboratoire d'Immunologie, [1]CHU Lyon Sud (Pierre Bénite), [2]Hôpital E Herriot (Lyon)

La définition de l'Hémophagocytose Lympho-Histyocytaire (HLH) a évolué depuis une 1ère description dans les années 30 en fonction des cas rapportés d'un même syndrome mais avec des étiologies différentes, des formes familiales ou secondaires à des infections, puis par la mise en évidence de mutations génétiques qui ont permis d'élucider les mécanismes physiopathologiques. La HLH est la conséquence d'une stimulation anarchique non contrôlée du système immunitaire aboutissant à un état d'hyperinflammation. Ceci est lié à une dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire se traduisant par une hyper-activation des lymphocytes et des hystiocytes (monocytes/macrophages, cellules dendritiques), potentiellement fatale. Ce syndrome se caractérise par une synthèse élevée de cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ dont les différentes actions expliquent les signes cliniques et biologiques retrouvés dans les HLH. Le déficit génétique ou transitoire de la fonction de cytotoxicité des CTLs et des cellules NK constitue le point commun et l'origine de ces perturbations biologiques et cliniques.

Il existe 2 groupes de HLH : les HLH primaires ou génétiques (les HLH familiales, les syndromes de Griscelli, Chediak-Higashi et Purtilo) et les HLH secondaires ou réactionnelles à des infections, des cancers, des médicaments. Le Syndrome d'Activation Macrophagique est une HLH secondaire, décrite dans le cadre de pathologies auto-immunes touchant des articulations (arthrite juvénile idiopathique, maladie de Still, LES..). La clinique est peu spécifique (fièvre prolongée, organomégalie, rush cutané, signes neurologiques), la biologie se caractérise par une cytopénie (2 ou 3 lignées), une hyper-triglycéridémie (≥3mmol/L) et hyper-ferritininémie (≥500µg/L), une hypofibrinogémie (≤1.5 g/L), la mise en évidence d'une hémophagocytose dans la moelle ou dans un organe atteint signe la HLH.

Parmi les critères diagnostiques recommandés, des examens immunologiques plus spécifiques des HLH, ont été développés à partir des mécanismes physiopathologiques : dosage du sCD25 (>2400U/mL élevé du fait de l'activation des lymphocytes), de sCD163 (récepteur Hb/haptoglobine des histyocytes), numération des lymphocytes CD8+ DR+ (augmentés), analyse des fonctions cytotoxiques des cellules NK en cytométrie (expression de CD107a après stimulation par des cellules K562) qui seront diminuées ou absentes, détection intracytoplasmique de la perforine et des granzymes, étude des mutations génétiques.

En cohérence avec les mécanismes physiopathologiques, le traitement consiste en une diminution d'activation des cellules de l'immunité (immunosuppresseurs, Etoposide, anti TNF-α, IVIg), associé au traitement des pathologies « déclencheuses » (infections, cancers, déficit immunitaire…), et dans les formes génétiques, la greffe de moelle osseuse.

FLOW CYTOMETRIC EVALUATION OF LYMPHOCYTE PROLIFERATION AS AN ALTERNATIVE TO TRITIATED THYMIDINE INCORPORATION MEASUREMENT

Fanny Poujol[1], Anne Portier[1,2], Christophe Malcus[2], Alexandre Pachot[1], Julien Texoris[1], Guillaume Monneret[1,2], Fabienne Venet[1,2]

1. *Mixed Research Unit Hospices Civils de LYON - bioMérieux Hôpital Edouard Herriot, Lyon*
2. *Immunology Laboratory, Hôpital Edouard Herriot, Lyon*

The tritiated-thymidine incorporation assay was developed in the 50's and has been since considered as the "gold standard" technique to assess lymphocyte proliferation in clinical laboratories, as well as a functional test to follow up patients' immune status.
As radioactivity handling is hazardous and associated waste management expensive, there is a real need for a safer but as robust test.Few years ago a new thymidine analog, the 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) has been synthesized. It is incorporated into DNA once put in proliferating cell environment before being covalently linked to a fluorescent azide molecule through a click-chemistry reaction. The number of incorporated EdU molecules per cell can then be evaluated by flow cytometry.

Objectives : The objective of this study was to compare this flow cytometric method of lymphocyte proliferation measurement to the "gold standard" technique of [^{3}H]-Thymidine incorporation assay.

Methods: The fluorescein-labelled Click-iT© assay from Invitrogen was tested on Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from either healthy volunteers or immuno-depressed patients. Optimal staining protocol was defined based on both manufacturers' instructions and litterature.
Then PBMCs proliferative response obtained after stimulation with various mitogens (PHA, Pokeweed, ConA, OKT3) was compared when measured by flow cytometry or [^{3}H]-Thymidine assay.

Results: Optimal staining protocol used 2µM of EdU incubated 2h with cells before performing the click-it reaction. T cell selection using anti-CD3 staining was appropriate to obtain a good cellular discrimination. Using this protocol, we proved that the EdU assay shows good discrimination between proliferating and quiescent cells.

Comparison with tritiated-thymidine assay showed good correlation. In particular, compared with the [^{3}H]-Thymidine incorporation assay, good responders, mild responders and non-responders were similarly identified.

Conclusion:

EdU incorporation assay with flow cytometry appears as a suitable alternative to the [^{3}H]-Thymidine assay for the measurement of lymphocyte proliferation.

EVALUATION DE LA REPONSE DES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS ET REGULATEURS A L'INTERLEUKINE 7 CHEZ DES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE

Guillaume Dupont[1,2], Julie Demaret[2,3], Fabienne Venet[2,3], Alain Lepape[5],
Arnaud Friggeri[5], Jérôme Morel[1], Guillaume Monneret[2,3].

(1) Département d'anesthésie réanimation, Centre hospitalier universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, F-42055
(2) Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Laboratoire d'Immunologie, Lyon, F-69003.
(3) Université Claude Bernard Lyon 1, EAM 4174, Lyon, F-69008, France
(5) Hospices Civils de Lyon, Service de Réanimation, Centre hospitalier Lyon-Sud, Pierre Bénite

Introduction : Les états septiques restent la première cause de mortalité des patients de réanimation. Le déficit immunitaire induit par le sepsis chez ces patients est actuellement bien démontré. Entre autres, on observe de profondes altérations lymphocytaires. L'interleukine-7 (IL-7) est une cytokine indispensable au développement et à la prolifération des lymphocytes T. L'objectif de ce travail est d'évaluer *ex vivo* sur sang total, la réponse des lymphocytes T effecteurs (Teff) de patients en choc septique à des doses croissantes d'IL-7 recombinante humaine (rhIL-7) en comparaison à la réponse des Treg qui expriment également le récepteur de l'IL-7 (CD127).

Matériel et méthodes : 11 patients en choc septique hospitalisés dans les services de réanimation des CHU de SAINT ETIENNE et de LYON SUD et 10 volontaires sains ont été inclus. Ex vivo, l'identification et l'activation des lymphocytes T en réponse à des doses croissantes de rhIL-7 a été évaluée par une nouvelle procédure de marquage intracellulaire (STAT5 phosphorylé et FOXP3) en cytométrie de flux.

Résultats : Nous avons mis en évidence une réponse dose dépendante des Teff et Treg à la rhIL-7. Le niveau maximal de réponse à la rhIL-7 des lymphocytes de patients septiques est similaire à celui des témoins. La réponse des Teff à la rhIL-7 est beaucoup plus importante que celle des Treg, avec une activation quasi spécifique des Teff vs Treg avec de faibles doses de rhIL-7 (rhIL-7 à 0.01 ng/ml, p=0.0356).

Discussion : A notre connaissance il s'agit de la première étude évaluant la réponse lymphocytaire à la rhIL-7 sur sang total de patients en choc septique en utilisant deux marquages intracellulaires. Nos résultats renforcent la possibilité d'une utilisation thérapeutique de l'IL-7 chez les patients septiques présentant une défaillance lymphocytaire et l'intérêt de cette nouvelle procédure de cytométrie pour le monitorage de l'effet de certaines drogues.

VIDEOMICROSCOPIE (TIME LAPSE) ET CYTOCOMPATIBILITE DES BIOMATERIAUX OSSEUX

Daniel Chappard GEROM,

Groupe Etude Remodelage Osseux et bioMatéraiux, Institut de Biologie en Santé, Angers.
Daniel.chappard@univ-angers.fr

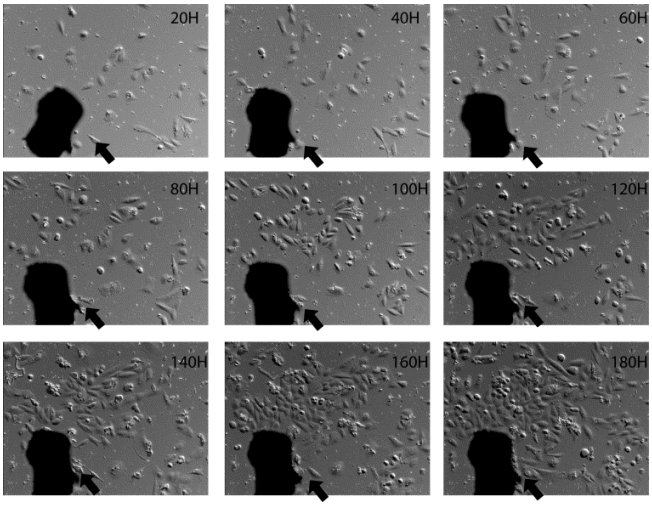
Les biomatériaux de substitution sont employés pour le comblement de défauts osseux spontanés (kystes) ou après chirurgie maxillo-faciale ou orthopédique. Si l'autogreffe osseuse reste le meilleur matériau connu, elle est nécessairement limitée en volume et impose une chirurgie additionnelle avec sa propre morbidité. Les autres matériaux sont représentés par l'allogreffe (mais la surveillance des banques d'os est onéreuse) et les matériaux naturels ou de synthèse. L'avantage de ces derniers est qu'ils sont fabricables en grandes quantités et ne présentent aucun risque de contamination bactérien, viral ou par agents non-conventionnels.

Parmi les matériaux de synthèse, le β-TCP est connu depuis les années 1980 comme étant une céramique ostéoconductrice et résorbable. L'ostéoconduction implique que les cellules ostéoformatrices (ostéoblastes) puissent reconnaitre la surface du matériau, s'y ancrer, proliférer et se mettre à apposer de la matrice osseuse nouvelle. La résorbabilité implique que des cellules de l'hôte puissent éroder et éliminer le matériau tout en maintenant une balance positive permettant *in fine* un gain d'os progressivement associé à une réduction du volume du matériau. La biocomaptibilité du β-TCP est assuré par ses propriétés physicochimiques de surface mais aussi par sa microarchitecture.

L'utilisation de lignées cellulaires est un avantage pour l'étude de la cytocomptatibilité de ces matériaux *in vitro*. De fragments de 100-200µm de granules de β-TCP (préparés par la technologie de la mousse polyuréthane) ont été incubés en présence de cellules osteoblast-like (SaOs-2) ou de cellules macrophagiques J-774-2 ainsi que de macrophages péritonéaux activés provenant de souris.

L'analyse par vidéomicroscopie a été réalisée sur une station Leica basée sur un DM6000, une caméra refroidie SNAP HQ2 CDD avec une résolution de 12-bit par niveau de gris, enceinte thermostatée et logiciel Métamorph. Les images ont été prises en microscopie Nomarski (DIC) sur 20 champs non-contigus (grâce à une platine motorisée) toutes les 20 min et pendant des temps de culture allant jusqu'à 8 jours. Les cultures ont ensuite été fixées et analysées en MEB. Des vidéos ont été réalisées à partir des prises séquentielles d'images.

Les SaOs-2 ont proliféré en se dirigeant vers les particules de β-TCP sur lesquelles elles se fixent et se déplacent sur les surfaces latérales pour finir par rejoindre les surfaces planes en superficie. Cette « escalade » des particules par les cellules suffit à mobiliser le biomatériau dans la chambre de culture.



Les cellules des lignées macrophagiques ne prolifèrent pas au contact du matériau mais adhèrent à la surface des particules et arrachent des grains ce qui provoque aussi des déplacements des particules.

Ces données *in vitro* confirment les analyses histopathologiques et nanotomographiques qui montrent l'érosion du matériau par des cellules macrophagiques (plutôt que des ostéoclastes et l'apposition directe d'ostéoblastes et de tissu osseux néoformé sur les particules.

DETECTION DE CELLULES TUMORALES CIRCULANTES (CTC) -TECHNOLOGIE CELLSEARCH (VERIDEX)

Dr. Adriana PLESA,

Laboratoire d'hématologie cellulaire-immunophénotypage, CHU Lyon Sud

Les **C**ellules **T**umorales **C**irculantes (CTC) correspondent du point de vue biologique à une nouvelle stratégie d'observation de la dissémination métastatique de cellules cancéreuses et leur détection ou caractérisation offrent des perspectives prometteuses en oncologie.

Extrêmement rares (1 sur 10 6 – 10 7 cellules sanguines nucléés), les CTC sont retrouvées dans les formes localisées et métastatiques de quasiment tous les cancers (sein, cancers digestifs, prostate, etc.). Les CTC sont des cellules épithéliales dont certaines semblent avoir subi une transition epithelio-mesenchymateuse au moins partielle ayant favorisé leur libération à partir de la tumeur d'origine, avec une capacité pro-métastatique variable. Elles diffèrent souvent de la tumeur primitive notamment au niveau de la sensibilité aux thérapies ciblées (présence de marqueurs de cellules souches, statut apoptotique, expression de récepteurs hormonaux HER2, mutations responsables de résistance aux inhibiteurs de TK).

La valeur pronostic de la détection des CTC par la méthode d'immunosélection CellSearch (Veridex) est démontrée par plusieurs études. C'est la seule technique automatisée, reproductible, validée « in vitro diagnostic » pour la détection dans le sang périphérique de CTC, actuellement la seule autorisée en routine clinique par la FDA comme une aide au management des traitements des cancers du sein, de la prostate et colorectaux. Commercialisé depuis 2004 elle reste le système de référence en 2014, actuellement utilisée dans près de 10 centres français. Elle utilise un immuno-enrichissement initial de cellules EpCAM+ (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), puis un triple marquage fluorescent DAPI (*noyau)*, A45B/B3 (*cytokeratines 8/18/19*) et CD45 (*leucocytes*).

Dans le cancer du sein métastatique les essais randomisés visant à démontrer l'intérêt de la prise de décision sur le compte de CTC sont en cours. En revanche, dans le cancer du sein non-métastatique, des patients M0 présentant de CTC ont un mauvais pronostic. Dans le cancer de la prostate, les CTC pourraient devenir le critère principal d'enregistrement des nouvelles molécules. Dans les cancers digestifs, les CTC sont surtout explorées pour leur information pronostique potentielle dans les stratégies « néo-adjuvants », en situation M0 ou M1 opérable.

Il s'agit donc maintenant de démontrer dans des études cliniques prospectives, que la prise en charge de cette information pronostique se traduit par un bénéfice clinique objectif pour les patients et déterminer si les CTC permettent de choisir de façon plus optimale le traitement, de surveiller son efficacité, pouvant devenir un nouveau critère de jugement lors de l'évaluation de nouveau schémas thérapeutiques.

Bibliographie :

1) F.C. Bidard : Cellules tumorales circulantes : quelles applications cliniques ?, La lettre du Cancerologue vol XX nr 5, mai 2011 ;

2) J. Y. Pierga : Applications cliniques des CTC en cancérologie mammaire, Correspondance en Onco-Thérabostique vol II, nr 4, 2013 ;

3) S Séronie Vivien : Les CTC : un nouveau challenge pour la biologie clinique oncologique, Ann Biol Clin 2014 ; 72(2) ; 153-77.

EMBRYONIC STEM CELLS ANTIGENS (ESCA) EXPRESSION

IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS

Tiphanie Picot[1], Carmen Mariana Aanei[1,2], Pascale Flandrin Gresta[1,2],
Emmanuelle Tavernier[1,3], Denis Guyotat[1,3], Lydia Campos Catafal[1,2]

[1]CNRS UMR5239, Université de Lyon, 42023, Saint-Etienne, France, [2]Laboratoire d'Hématologie, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne, France, [3]Department of Hematology, Institut de Cancérologie Lucien Neuwirth, 42070 Saint Priest en Jarez, France

Acute Myeloid Leukemia (AML) is characterized by the expansion and resistance to apoptosis of myeloid cells blocked in early stages of differentiation. A subset of stem or progenitor cells, termed leukemic stem cells (LSC), which retain or reacquire self-renewing properties, as well as the capacity to remain in a poorly differentiated stage, give rise to the leukemic clone. The identification and purification of the LSC can provide a powerful tool for diagnosis, prognosis and therapy. Several studies suggested that LSC belong to the CD34+ CD38- compartment.

Self-renewal and lack of differentiation are properties of embryonic and induced pluripotent stem cell which specifically express a set of differentiation antigens (SSEA1 and SSEA3) and transcription factors (OCT¾, SOX2, and NANOG), designated as ESCA. We postulate that an epigenetic reprogramming could induce the ESCA expression on HSC.

The aim of our study was to investigate the expression ESCA in the CD34+CD38- cells from normal bone marrow (NBM) and from 50 AML BM patients. Then compare ESCA's expression between CD34+CD38- and CD34+CD38+ cells.

We studied the expression in 5 cell lines (NTERA-2 which is control cell line, KG1a, U937, THP-1 and HL60 leukemic cell lines) and their potential involvement in myeloid differentiation in 2 cell lines (HL60 and THP-1). Thereafter, we inhibited the expression of ESCA in 3 leukemic cell lines (HL60, KG1a and U937) to better understand their role in abnormal proliferation or differentiation.

The preliminary experiments showed an important expression of ESCA on all 5 cell lines by Multicolor Flow Cytometry (MFC), confirmed by RT-PCR.

Then, we compared the expression of ESCA in CD34+CD38- cells between normal and leukemic marrow. We observed an up-regulation of two transcription factors OCT3/4 and SOX2 and the protein SSEA3 with 2-fold higher expression in AML cells compared to normal HSC. In addition, we found the down regulation of SSEA1 protein involved in cell adhesion, migration and differentiation.

We also compared the expression of ESCA between the CD34+CD38- and CD34+CD38+ AML population. We observed a higher expression of OCT3/4 and SSEA3 (1.3-fold) in CD34+CD38-. We found a higher expression of SSEA1 (1.9-fold), NANOG and SOX2 (1.2-fold) in AML CD34+CD38+ population compared to CD34+CD38- population.

We investigated whether there was a relationship between the overexpression of ESCA and a cytogenetic subgroup of AML. We found that AML t(15;17) expressed OCT3/4 at higher level than the other ESCA.

Finally, the inhibition experiments showed that Oct3/4 was strongly inhibited in the KG1a cell line.

In conclusion, these results suggest that the deregulation of ESCA may have a potential role in leukemogenesis by maintaining the LSC properties. This prompts us to test the relevance of these markers for LSC identification and as therapeutic strategies.

PROCHAINES RÉUNIONS DE CYTOMÉTRIE

THE UNIVERSITY OF VALENCIA (SPAIN),

7-18 JULY 2014

SECOND INTERNATIONAL SUMMER SCHOOL ON CYTOMETRY (ISSC)

*Organized by the **European Society for Clinical Cell Analysis** in collaboration with the University of Valencia, the Principe Felipe Research Center, the Iberian Society of Cytometry and ESCCA Industrial Partners*

http://www.escca.eu/meetings/summer-school

7-11 juillet 2014

- **FUNCTIONAL CYTOMETRY: UNDERSTANDING AND APPLYING CYTOMIC ASSAYS**
- **ADVANCED APPLICATIONS OF CYTOMETRY IN HEMATOLOGY**

14-18 July 2014

- **APPLICATIONS OF CYTOMETRY IN DRUG RESEARCH AND TOXICOLOGY**
- **APPLICATIONS OF CYTOMETRY IN STEM CELL RESEARCH AND THERAPY**

Diplômes universitaires cytométrie

Diplôme de cytométrie de Grenoble

Diplôme inter-universitaire de Saint-Etienne en 2014-2015

Congrès européen de cytométrie ESCCA

Cours européen de cytométrie	LISBONE	14-15 septembre 2014
Congrès européen de cytométrie	LISBONE	15-18 septembre 2014
Journée européenne thématique de microbiologie		17 septembre 2014

Congrès Français de cytométrie AFC

JT	Basophile	9 octobre 2014
Congrès Français de cytométrie	LILLE	4 au 6 novembre 2014
JT	Thématique Cytométrie et Imagerie	3 février 2015

15ème anniversaire

AVEC LE SOUTIEN DE :