

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Chers ami(e)s,

Le développement de méthodes à haut débit permettant d'acquérir des masses considérables de données génotypiques ou phénotypiques sur un sujet, une population cellulaire ou même une cellule unique a placé la cytométrie au coeur de la biologie et de la médecine. La pluridisciplinarité, pratiquée depuis le premier jour par les "cytométristes", est maintenant considérée comme une condition presque nécessaire du progrès scientifique.

Les résumés que nous vous présentons illustrent parfaitement cette situation. Des présentations fondamentales nous laissent attendre le développement de méthodes d'analyse encore plus puissantes et précises. D'autres travaux montrent comment les mesures quantitatives peuvent améliorer notre compréhension des organismes les plus divers, du virus à l'homme. Enfin, les outils de la cytométrie sont quotidiennement utilisés pour explorer les patients dans nos hôpitaux.

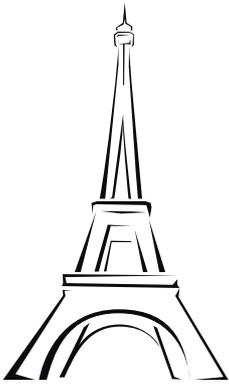
Nous remercions tous les conférenciers qui ont accepté de nous présenter leurs résultats et de consacrer du temps, une denrée de plus en plus rare, à la rédaction des résumés. Merci également à tous les participants à ce congrès qu'ils enrichiront de leur présence et de leurs questions.

La richesse et la diversité des communications rassemblées dans ce livret nous promettent des journées passionnantes. Nous vous souhaitons d'en profiter pleinement.

Bien cordialement,

Bernard Chatelain
Pour le bureau de l'AFC

Pierre Bongrand
Pour le comité d'organisation



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Remerciements

L'Association Française de Cytométrie

tient à remercier les organismes et les sociétés qui ont apporté leur soutien à l'organisation du 15^e Congrès Annuel de l'AFC.

Alexion Pharma



Cobolt



BD Biosciences
Accuri



Dako



Beckman
Coulter



eBioscience



Celeza



Enzo Life
Science



ChemoMetec



Excilone

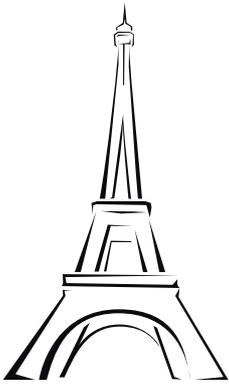


Clinisciences



Horiba





Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Remerciements

L'Association Française de Cytométrie

tient à remercier les organismes et les sociétés qui ont apporté leur soutien à l'organisation du 15^e Congrès Annuel de l'AFC.

Life
Technologies



Partec



Merck Millipore



PerkinElmer



Miltenyi Biotec



Proteigene



Morphosys



Sartorius
Stedim



Ovizio



Stemcell



Oxxius Lasers

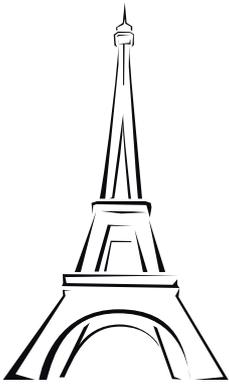


Thermo
Scientific



Ozyme





Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Remerciements

L'Association Française de Cytométrie

tient à remercier les organismes et les sociétés qui ont apporté leur soutien à l'organisation du 15^e Congrès Annuel de l'AFC.

Biospace Lab



Roche



Celgene



Tebu-bio



Domaine
Madeloc



UFR
des Sciences
de la Vie



Dominique
Dutscher



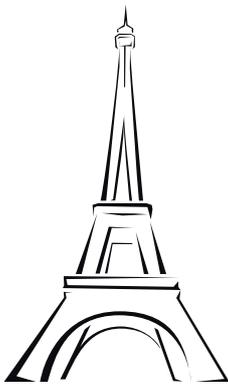
VWR
International



Mairie de Paris







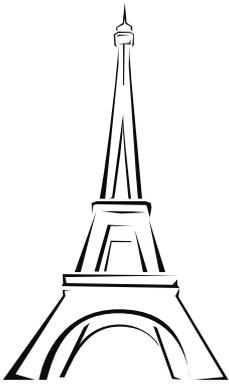
Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Sommaire

■ Programme	P06
■ Résumés des communications du mercredi 26 octobre	P15
P1 - SESSION PLENIERE AVANCEES TECHNOLOGIQUES	P15
SP1 HEMATOLOGIE	P22
SP2 IMAGERIE	P30
SP3 APOPTOSE	P33
SP4 CANCEROLOGIE	P37
SP5 MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE	P40
SP6 NEUROBIOLOGIE	P44
■ Résumés des communications du jeudi 27 octobre	P49
SP7 BIOLOGIE ANIMALE	P49
SP8 CYCLE CELLULAIRE	P55
SP9-1 FORUM DES TECHNICIENS	P62
SP10-1 IMMUNOLOGIE 1	P67
SP9-2 FORUM DES TECHNICIENS	P73
SP11 BIOLOGIE VEGETALE	P80
P2 - SESSION PLENIERE HEMATOLOGIE 2	P84
SESSION JEUNES CHERCHEURS	P90
■ Résumés des communications du vendredi 28 octobre	P97
SP10-2 IMMUNOLOGIE 2	P97
SP12 IMAGERIE MEDICALE	P103
SP13 MICROBIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE	P106
SP14 SESSION PLATEFORMES	P110
SP15 CELLULES SOUCHES	P115
SP16 HEMATOLOGIE CLINIQUE	P119
■ Résumés des posters	P128
■ Liste des participants	P142
■ Liste des exposants	P157
■ Plan de l'exposition	P161
■ Notes	P162
■ Plan de situation	P165



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Mercredi 26 octobre 2011

08:15-09:30 Enregistrement

09:30-10:00 Mot de bienvenue

10:00-12:00 **P1 - SESSION PLÉNIÈRE : AVANCÉES TECHNOLOGIQUES Salon Adenauer**

Modérateurs : Anne Kornreich (Mons) et Vincent Genty (Troyes)

10:00-10:30 **STED Microscopy in Neurobiology**

Valentin Nagerl (Bordeaux)

10:30-11:00 **Mass Cytometry Antonio Cosma (Fontenay-aux-Roses)**

11:00-12:00 • **Communications sélectionnées**

- **Stabilité des échantillons après prélèvement** *Claude Lambert (Saint-Etienne)*

- **Cytométrie en flux multi-couleur des microparticules : du monitoring des techniques de séparation à l'immuno-phénotypage des échantillons cliniques** *Tarik Bouriche (Marseille)*

- **Comparaison de deux cytometres de paillasse utilisés pour l'évaluation de la qualité de la semence bovine** *Eliaou Sellem (Maison Alfort)*

12:00-12:45 **SYMPOSIUM ALEXION Salon Adenauer**

Hémoglobinurie nocturne paroxystique : les recommandations internationales en pratique quotidienne

13:00-14:00 DÉJEUNER *Fondation Biemans-Lapôte*

14:00-15:00 VISITE EXPOSITION - POSTERS Salon Honnorat - Galerie gauche Salon Adenauer

15:00-16:30 SP1 - HÉMATOLOGIE 1 Salon Adenauer

Modérateurs : Bernard Husson (Maine Saint-Paul) et Jean-Pierre Marie (Paris)

• **Proposition du GEIL pour un protocole de consensus pour la quantification des plasmocytes : application au diagnostic différentiel entre MGUS et Myélome multiple**
Jean Feuillard (Limoges)

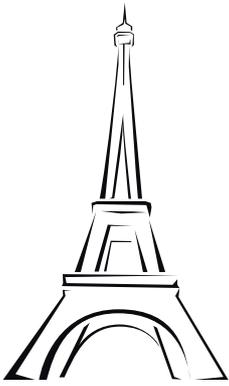
• **Protéines ABC et résistance aux chimiothérapies dans les LAM** *Olivier Legrand (Paris)*

• **Communications sélectionnées**

- **Degré de maturation des blastes de Leucémie Myeloblastique selon l'expression de CD90 et CD133** *Lauren Rigollet (Saint-Etienne)*

- **Mise en place et amélioration du protocole d'Ogata pour le diagnostic par cytométrie en flux des Myelodysplasies** *Estelle Guérin (Limoges)*

- **Validation de la quantification de l'hémorragie foetomaternelle en cytométrie en flux par le kit FMH QuikQuant Trillium Diagnostics/Beckman Coulter** *Cédric Pastoret (Rennes)*



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Mercredi 26 octobre 2011

15:00-16:30 SP2 - IMAGERIE (anglais) Salon Gulbenkian

Modérateurs : Winnok De Vos (Gent) et Tristan Piolot (Paris)

- One molecule at a time: from super-resolution imaging to single particle tracking of nuclear factors *Ignacio Izeddin (Paris)*
- Nuclear dynamics in the context of laminopathies *Winnok De Vos (Gent)*

15:00-16:30 SP3 - APOPTOSE Salon David Weill

Modérateurs : Nicole Schaaf (Liège) et Vincent Rincheval (Versailles)

- From the study of apoptosis inhibition due to cardiolipin deficiencies to giant unilamellar vesicles mimetic of mitochondrial contact sites: a walk with cytometry *Patrice Petit (Paris)*
- Un flux calcique entre le reticulum endoplasmique et la mitochondrie contribue à l'apoptose induite par le poliovirus *Bruno Blondel (Paris)*
- Communication sélectionnée
- L'infection par le VIH/VIS sensibilise les monocytes et les cellules dendritiques à l'apoptose *Laure Campillo-Gimenez (Paris)*

16:30-17:30 VISITE EXPOSITION - POSTERS - PAUSE CAFÉ

Salon Honnorat - Galerie gauche Salon Adenauer

17:30-19:00 SP4 - CANCÉROLOGIE (anglais) Salon Adenauer

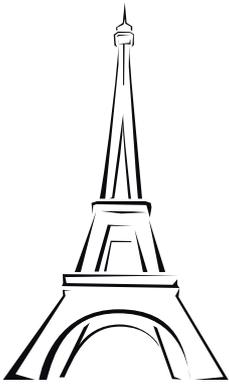
Modérateurs : Chantal Housset (Paris) et Winnok De Vos (Gent)

- Exploring the neuroblastoma epigenome: perspectives for the discovery of prognostic biomarkers *Maté Ongenaert (Gent)*
- The genetic complexity of renal cancer cells *Robert Koesters (Paris)*

17:30-19:00 SP5 - MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE Salon David Weill

Modérateurs : Marielle Bouix (Thiverval-Grignon) et Jean Reyes (Lyon)

- Apports de la cytométrie en flux dans le développement et le suivi de procédé de production de vaccins *Caroline Sellin (Marcy l'étoile)*
- A new tool to enumerate and analyse activity of *Bifidobacterium* in dairy product based on flow cytometry *Jing Geng (Palaiseau)*
- Communication sélectionnée
- Enhancement of viability of *Bifidobacterium Animalis* subsp. *Lactis* BB12 during storage in organic fermented milk is related to bacterial fatty acids membrane *Anna Carolina Florence (Thiverval-Grignon)*



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Mercredi 26 octobre 2011

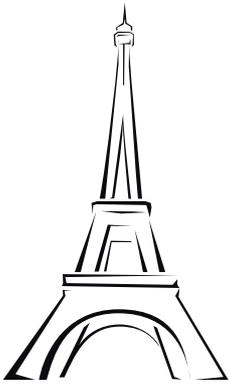
17:30-19:00 **SP6 - NEUROBIOLOGIE Salon Gulbenkian**

Modérateurs : Etienne Herzog (Paris) et Alvaro Rendon (Paris)

- **Convergence et ségrégation des territoires de projections striatal du cortex préfrontal. Analyse tri-dimensionnelle comparative entre le rat et le singe** *Philippe Maily (Paris)*
- **Marqueurs combinatoires pour suivre le lignage cellulaire et la circuiterie neuronale** *Jean Livet (Paris)*
- **Tri cellulaire de neurones génétiquement marqués pour l'analyse du transcriptome et cycle cellulaire** *Alessandra Pierani (Paris)*
- **Tri de synapse par fluorescence : purification des synapses excitatrices du cerveau de souris** *Etienne Herzog (Paris)*

19:00 **COCKTAIL DE BIENVENUE**

20:30 **CROISIÈRE PROMENADE**



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Jeudi 27 octobre 2011

08:30-10:00 **SP7** - BIOLOGIE ANIMALE *Salon Gulbenkian*

Modérateurs : Evelyne Meyer (Gent) et Ludovic Freyburger (Maison-Alfort)

- **Sous-populations de cellules dendritiques : le porc, chaînon manquant entre la souris et l'homme** *Nicolas Bertho (Jouy-en-Josas)*
- **Mechanisms of host specific recognition of Bartonella species**
Muriel Vayssier-Taussat (Maisons-Alfort)
- **Glycine and its N-methylated analogues cause pH-dependent membrane damage to porcine enterotoxigenic Escherichia coli** *Donna Vanhauteghem (Merelbeke)*
- **Flow cytometric detection of myeloperoxidase in horse neutrophils: a novel technique in equine diagnostic research** *Jella Wauters (Merelbeke)*
- **Caractérisation phénotypique de cellules souches somatiques dérivées du muscle chez le chien** *Blandine Lieubeau (Nantes)*

08:30-10:00 **SP8** - CYCLE CELLULAIRE *Salon Adenauer*

Modérateurs : Sarah Baatout (Mol) et Joelle Sobczak (Paris)

- **Rôle de la Cycline G de Drosophila Melanogaster dans le cycle cellulaire** *Floria Faradji (Paris)*
- **Cell cycle, apoptosis and DNA repair of cells in space conditions** *Michaël Beck (Mol)*
- **Mise en place des différents systèmes de restriction d'expression de la cytidine deaminase AID en phases G1 ou S/G2/M du cycle cellulaire** *Marija Zivojnovic (Paris)*
- **Analyse de la division cellulaire chez la levure S. cerevisiae par imagerie en flux avec l'ImageStream X** *Aurélie Floch (Paris)*
- **Les bonnes pratiques pour mesurer le contenu en ADN par cytométrie en flux**
Xavier Ronot (La Tronche)

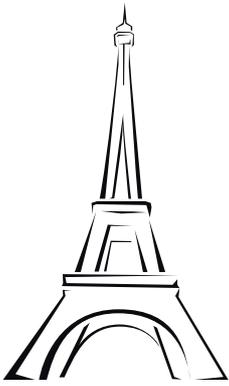
09:00-10:00 **SP9-1** - FORUM DES TECHNICIENS *Salon David Weill*

Modérateurs : Annie Munier (Paris) et Yvan Cornet (Yvoir)

- **Cytométrie: out of control** *Nathalie Jouy (Lille)*
- **Tri de cellules endothéliales et hématopoïétiques d'embryons de poulet**
Pierre-Yves Canto (Paris)
- **Communication sélectionnée**
- **Dépistage des pathologies Lymphocytaires par immunophénotypage sur Accuri C6**
Yvan Cornet (Yvoir)

10:00-11:00 VISITE EXPOSITION - POSTERS - PAUSE CAFÉ

Salon Honorat - Galerie gauche Salon Adenauer



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Jeudi 27 octobre 2011

11:00-12:30 SP10-1 - IMMUNOLOGIE 1 (anglais) Salon Adenauer

Modérateurs : Christian Demanet (Bruxelles) et Jean-Jacques Lataillade (Clamart)

- **Immunosuppressive properties of Mesenchymal stem cells** *Massimo Giuliani (Clamart)*
- **Rapid generation of full clinical grade human anti-virus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy** *Danièle Bensoussan (Nancy)*
- **Communications sélectionnées**
- **Apports de la cytométrie multiparamétrique pour l'exploration fonctionnelle de la réponse immunitaire innée dans un système cellulaire complexe** *Françoise Gondois-Rey (Marseille)*
- **Investigation of the phenotype of TAP-deficient natural killer (NK) cells by 13-color flow cytometry** *Marwan Sleiman (Luxembourg)*

11:00-12:30 SP9-2 - FORUM DES TECHNICIENS (hématologie) Salon David Weill

Modérateurs : Annie Munier (Paris) et Yvan Cornet (Yvoir)

- **Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic d'un syndrome myélodysplasique** *Sonia Demartin (Haine-St-Paul)*
- **Exploration du déficit en granules denses plaquettaires par le test à la Mèpacrine : standardisation de la méthode** *Nicolas Bailly (Yvoir)*
- **Immunocomptage plaquettaire : comparaison technique simple plateforme et double plateforme** *Claire Loosen (Yvoir)*
- **Etude de la résistance aux drogues (MDR) avec la sonde JC-1 dans les Leucémies Aigues Myéloïdes** *Régine Lautier (Paris)*

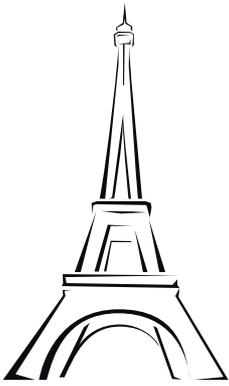
11:00-12:30 SP11 - BIOLOGIE VÉGÉTALE Salon Gulbenkian

Modérateurs : Nathalie Taquet (Nice) et Spencer Brown (Gif-sur-Yvette)

- **cytometry approaches as tools to decipher the functional role of endopolyploidy** *Nathalie Frangne (Villenave d'Ornon)*
- **Chloroplast/nucleus interactions and cell cycle regulation in Arabidopsis** *Cécile Raynaud (Orsay)*

12:30-13:30 DÉJEUNER Fondation Biemans-Lapôte

13:30-14:00 VISITE EXPOSITION - POSTERS Salon Honnorat - Galerie gauche Salon Adenauer



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Jeudi 27 octobre 2011

14:00-15:00 SYMPOSIUM CELGENE Salon Adenauer

Myelodysplasies et cytométrie *Michaëla Fontenay (Paris) et Arjan A. Van de Loosdrecht (Amsterdam)*

15:00-16:30 P2 - SESSIONS PLÉNIÈRE : HÉMATOLOGIE 2 (anglais) Salon Adenauer

Modérateurs : *Barbara Denys (Gent) et Luc Douay (Paris)*

- **Biological micro-nanoparticles: technological and clinical advancements**
François Mullier (Namur)
- **Intérêt de la cytométrie en flux dans l'évaluation du pronostic des leucémies aiguës**
Frédéric Feger (Paris)
- **Communication sélectionnée**
 - **Quantification of microparticles by flow cytometry in whole blood: application to the diagnosis of hereditary spherocytosis** *Nicolas Bailly (Yvoir)*

16:30-17:30 VISITE EXPOSITION - POSTERS - PAUSE CAFÉ

Salon Honnorat - Galerie gauche Salon Adenauer

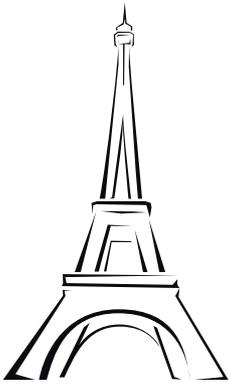
17:30-18:30 SESSION JEUNES CHERCHEURS Salon Adenauer

Modérateurs : *Bernard Chatelain (Yvoir) et Dirk Van Bockstaele (Mechelen)*

- **Communications sélectionnées**
 - **Réconcilier EDU et GFP : yes we can!** *Mickeal Bourge (Gif-sur-Yvette)*
 - **Detection of platelet-derived microparticles: an alternative strategy for the diagnosis of type-II heparin-induced thrombocytopenia** *François Mullier (Yvoir)*
 - **Fetal progenitor cells naturally transferred through pregnancy participate in inflammation and angiogenesis during wound healing** *Dany Nassar (Paris)*
 - **Détection par multi-marquages des plasmocytes tumoraux résistants après haute dose de Melphalan : mise en évidence d'une fenêtre thérapeutique optimale.** *Laure Vincent*

18:30-19:30 ASSEMBLÉE GÉNÉRALE : AFC Salon Adenauer et BVAC/ABCA Salon Gulbenkian

19:30 SOIRÉE DE GALA



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Vendredi 28 octobre 2011

09:00-10:30 **SP10-2** - IMMUNOLOGIE 2 *Fondation Biemans-Lapôte*

Modérateurs : Filomena Conti (Paris) et Carole Elbim (Paris)

- **Nouvelles notions sur les causes de l'hyperactivité du système immunitaire dans l'infection par VIH-1 apportées par la cytométrie en flux 13 couleurs**
Charles-Antoine Dutertre (Paris)
- **Premature immune risk phenotype in subjects thymectomized during early childhood**
Delphine Sauce (Paris)
- **Communications sélectionnées**
- **La progression vers le stade SIDA est associée à l'émergence de cellules INKT productrices d'IL-17, dès la phase précoce de l'infection par le VIS**
Laure Campillo-Gimenez (Créteil)
- **Effet des immunoglobulines intraveineuses sur les fonctions des polynucléaires neutrophiles** *Sarah Casulli (Paris)*
- **Les inhibiteurs de mtor, après transplantation hépatique, induisent une augmentation des cellules T régulatrices, en préservant leur fonction suppressive.** *Khaldoun Ghazal (Paris)*

09:00-10:30 **SP12** - IMAGERIE MÉDICALE *Salon Gulbenkian*

Modérateur : Corinne Laplace-Builhé (Villejuif)

- **Early detection of resistance to anti-tumoral drugs by fluorescence imaging**
Marie-Pierre Fontaine-Aupart (Orsay)
- **Imagerie clinique à l'échelle cellulaire : le défi de l'endomicroscopie confocale in vivo pour la cancérologie** *Muriel Abbaci (Villejuif)*
- **Table ronde : les perspectives de l'imagerie photonique en clinique**

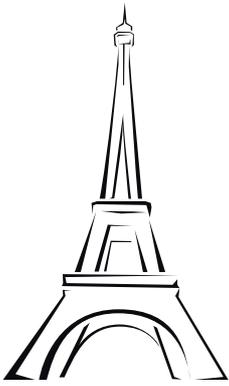
09:00-10:30 **SP13** - MICROBIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE *Salon David Weill*

Modérateurs : Alice Da Rocha (Paris) et Jean-Jacques Pernelle (Antony)

- **Apport de la cytométrie en flux pour le suivi de l'état métabolique des populations bactériennes au sein d'une matrice complexe : application aux boues activées**
Audrey Prorot (Limoges)
- **Application of flow cytometry for the rapid quantification of viable bacteria and biomass in wastewater and activated sludge** *Sabrina Tamburini (Trento)*
- **Assessment of bacteria in wastewater treatment plants using flow cytometry and fluorescence in situ hybridization** *Stefano Papa (Urbino)*

10:30-11:00 VISITE EXPOSITION - POSTERS - PAUSE CAFÉ

Salon Honnorat - Galerie gauche Salon Adenauer



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Vendredi 28 octobre 2011

11:00-12:30 **SP14** - SESSION PLATEFORMES *Salon Gulbenkian*

Modérateurs : Anne Marie Faussat (Paris), Peggy Sanatine (Evry) et Christophe Duperray (Montpellier)

- **Le référentiel ISO 9001 appliqué aux activités de recherche et de plateforme technologique**
Jennifer Jund-Riegert (Strasbourg)
- **Standard safety Practices for sorting of unfixing cells** *Fabrice Maréchal (Evry)*
- **Méthodologie de mesure pour la validation de systèmes de protection sur les cytomètres**
Dominique Bouilly (Mainvilliers)
- **proposition d'un groupe de travail pour verifier l'efficacite des solutions internes de cap-
tage a la source sur les cytomètres - trieurs** *Jacques Simons (Le Kremlin-Bicetre)*

11:00-12:30 **SP15** - CELLULES SOUCHES (anglais) *Salon David Weill*

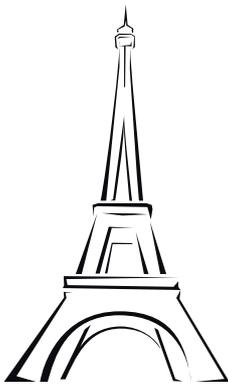
Modérateurs : Ada Collura (Paris) et Jean-François Mayol (La Tronche)

- **Flow cytometry for brain stem cells in its infancy: pitfalls and promises**
Marc-André Mouthon (Fontenay-aux-Roses)
- **Cell surface markers in the identification and characterization of cancer stem cells**
David Silvestre (Paris)
- **Communication sélectionnée**
- **Viability and proliferation of preadipocytes in layer-shaped alginate hydrogels**
Bianca Galateanu (Bucarest)

11:00-12:30 **SP16** - HÉMATOLOGIE CLINIQUE *Fondation Biemans-Lapôte*

Modérateurs : Bernard Chatelain (Yvoir) et Bernard Drénou (Mulhouse)

- **Myélome : la maladie résiduelle dans le protocole IFM/DFCI 2009** *Nelly Robillard (Nantes)*
- **Le lymphome splénique diffus de pulpe rouge : une entité clinico-pathologique et
moléculaire distincte du lymphome splénique de la zone marginale** *Lucile Baseggio (Lyon)*
- **Leucémie à tricholeucocytes : la maladie en CMF a t-elle un intérêt?**
Francine Garnache Ottou (Besançon)
- **Communications sélectionnées**
- **L'augmentation de l'expression de ZAP70 dans les lymphocytes T de LLC explique
pourquoi le ratio T/B ne reflète pas le niveau d'expression de ZAP70 dans les cellules B
tumoraux** *Jean Feuillard Rizzo (Limoges)*
- **Expression différentielle de BCl2 et de BCl6 en cytométrie en flux dans les lymphocytes B
centro-germinaux normaux et tumoraux** *Agathe Debliquis (Mulhouse)*
- **Intégration des informations phénotypiques et génétiques dans le diagnostic et le suivi du
myélome** *Stéphanie Max (Liège)*



Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Programme

Vendredi 28 octobre 2011

12:30-13:30 DÉJEUNER

13:30-15:00 Hematology Working groups - Groupes de travail en hématologie **Salon David Weil**

Modérateurs :

Groupe FranceFlow : Vahid Asnafi,

G.E.I.L : Marie Christine Béné

ABCA BVAC : Pieter De Schouwer

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

**P1 SESSION PLÉNIÈRE :
AVANCÉES TECHNOLOGIQUE**



I- 1. SUPERRESOLUTION STED MICROSCOPY IN NEUROBIOLOGY

Dr. U. Valentin Nägerl

Institute for Interdisciplinary Neuroscience, CNRS / Université Bordeaux Segalen
146, rue Léo Saignat - 33076 Bordeaux, France, valentin.nagerl@u-bordeaux2.fr

Neuronal synapses are composed of a pre- and a postsynaptic membrane specialization, forming elementary functional compartments for rapid and flexible signaling in the central nervous system. Understanding how synapses are built during development and modified by experience is a central theme for neuroscience.

However, as they are typically very small (< 1 nm), as they are typically very small (< 1 nm) signaling in the central nervous system. U

However, major advances in superresolution imaging and fluorescence labeling are greatly improving our ability to investigate the inner life and dynamics of synapses using live-cell imaging approaches. We have previously shown that superresolution STED microscopy is a powerful technique for live-cell imaging of synapse morphology using YFP as a genetically encoded volume-label.

We will review our recent progress in adapting STED microscopy for live-cell nanoscale imaging deep inside biological tissue and in two colors simultaneously. Specifically, we will demonstrate the powerful potential of these methodological advances for several applications concerning superresolution imaging of synapses: 1) spine plasticity and actin dynamics using lifeact 2) nanoscale imaging up to 120 μm deep below tissue surface and 3) dual-color, live-cell imaging of pre- and postsynaptic structures with nanoscale spatial resolution using spectral unmixing of GFP and YFP and other popular green fluorescent dyes.



I-2. MASS CYTOMETRY

Antonio Cosma

Division of Immuno-Virology, Institute for Emerging Diseases and Innovative Therapies, DSV, CEA, Fontenay-aux-Roses, France

Flow cytometry is a single cell technology currently used for research and clinical applications. By using flow cytometry, immunologists have been able to unravel a multitude of phenotypically different cells and study their role in health and disease. Moreover, in vaccine research flow cytometry based assays are replacing highly standardized immune monitoring technologies such as the ELISpot assay.

Most laboratories are able to perform staining using 6-8 different markers and advanced instruments are now able to measure 18-20 parameters. However, the nature of the fluorochemicals used to tag antibodies and the optical system of detection limit further evolution of this technology in terms of the number of parameters analyzed simultaneously.

Mass cytometry is a major outbreak in the field of single cell technologies applied to immunology. The key innovations are a different chemical nature of the labels and a non-optical detection system based on mass spectrometry. Antibodies are conjugated to metals, specifically, transitional elements isotopes normally absent in biological systems. These conjugates are used as in other flow-cytometry based protocols to label cells of interest. Cells labeled with metal tagged antibodies are then, vaporized in a spray chamber and delivered as single cells to a plasma chamber, where they are atomized and ionized. Each cell originates a cloud of ions that is analyzed by time of flight (TOF) mass spectrometry. The main advantages of this innovative technology are the absence of overlap among different detection channels and the possibility to analyze virtually up to 100 parameters.

Data analysis is the less developed aspect of classical flow cytometry and with the advent of mass cytometry the complexity of data will increase. As a consequence, the classical gating procedure on bi-dimensional plots will become obsolete and a major challenge of mass cytometry will be the development of new tools able to manage such amount of data.



II-1. STABILITÉ DES ÉCHANTILLONS APRÈS PRÉLÈVEMENT MESURE PAR UN NOUVEAU CYTOMETRE EN IMAGE CHEMOMOTEC NC 3000

Frédéric Gruy et Claude Lambert

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

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

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

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

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

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



II-2. CYTOMÉTRIE EN FLUX MULTI-COULEUR DES MICROPARTICULES: DU MONITORING DES TECHNIQUES DE SÉPARATION À L'IMMUNOPHÉNOTYPAGE DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES.

T. Bouriche¹, P. Poncelet¹, C. Judicone^{1,2}, S. Robert³, R. Lacroix^{2,3}, F. Dignat-George^{2,3}

- 1) BioCytex R&T, Marseille (tarik.bouriche@biocytex.fr),
- 2) Laboratoire d'Hématologie, CHU La Conception, AP-HM, Marseille
- 3) INSERM UMR-S608, Université Aix-Marseille II, Marseille

Les microparticules (MP) sont des vésicules issues du bourgeonnement de la membrane plasmique de différentes cellules sous l'effet d'une activation ou d'un stress apoptotique. Hétérogènes en taille (0.1 à 1 µm), riches en phosphatidylsérine et dotées d'un phénotype antigénique souvent caractéristique de leur cellule d'origine, elles sont retrouvées à l'état physiologique dans tous les liquides biologiques dont le plasma. Ce dernier contient plusieurs sous-types de MP d'origines diverses (Totales PS+ ou TMP, plaquettaires ou PMP, érythrocytaires ou Ery-MP, lymphocytaires ou Ly-MP, myélo-monocytaires ou Myelo-MP et endothéliales ou EMP) dont les taux peuvent varier en pathologie et représenter potentiellement de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique. La validation de ces biomarqueurs réclame des techniques bien standardisées. Bien que largement utilisée, la cytométrie en flux (CMF) est à la limite de ses capacités du fait de la petite taille des MP (1) ce qui oblige à remanier en profondeur des protocoles déjà couramment appliqués sur cellules. Entre autres, l'immuno-phénotypage multi-couleur des MP réclame des adaptations spécifiques. Le protocole 4 à 5 couleurs que nous présentons dans ce travail a été mis au point sur un cytomètre à trois lasers (bleu, rouge, violet, Gallios, Beckman-Coulter) avec une coupe standardisée en FS à 0,3µm. Le panel sélectionné i) vise des cibles largement représentées sur les MP, ii) utilise des fluorochromes qui limitent le recours à la compensation et iii) différencie efficacement les sous-populations majeures: sur le squelette de base en 4-c fait de Annexin V-FITC (TMP), CD41-APC (PMP), CD235a-AA750 (EryMP), CD15-PB (Myelo-MP), le canal PE (voire PC7) reste libre pour analyse éventuelle en 5-c (voire 6-c) d'un marqueur complémentaire, tout en conservant une maîtrise simple des compensations. La validation du protocole a mis en jeu i) la comparaison des comptages de MP en bi-, tri- et quadri-couleur et ii) plusieurs épreuves de spécificité (inhibition spécifique par AcM "froid", élimination globale des MP par ultra-centrifugation ou filtration, extraction sélective de sous-populations de MP par immuno-séparation magnétique - IMS). L'intérêt de ce protocole sera illustré i) par le monitoring d'extractions différentielles de MP par IMS et ii) par des exemples d'immuno-phénotypage sur plasma normaux et pathologique. Ce type de protocole est pour notre laboratoire de développement un outil majeur dans l'optimisation de tests fonctionnels spécifiques à certains sous-type de microparticules (2). L'application d'un tel protocole en routine hospitalière devrait permettre une analyse complète, rapide et économique des principaux sous-types de MP.

- 1) R Lacroix et al, Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. Seminars Thromb Haemost 2010; 36:807-818
- 2) Lacroix R, Poncelet P, Bouriche T, et al , A new approach for measurement of MP-associated plasmin generation. J Thromb Haemos 2011, 9 (Suppl. 2) (2011) 13, abst O-MO-012.



II-3. COMPARAISON DE DEUX CYTOMETRES DE PAILLASSE UTILISES POUR L'EVALUATION DE LA QUALITE DE LA SEMENCE BOVINE

E. Sellem⁽¹⁾, *F. Bréard*⁽²⁾, *O. Gérard*⁽¹⁾, *B. Guérin*^(2,1), *N. Pozzi*⁽²⁾, *C. Ponsart*^(2,1)

⁽¹⁾UNCEIA, Département R&D, ⁽²⁾Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs, 13 rue Jouët, 94704 Maisons-Alfort

eli.sellem@unceia.fr

L'insémination animale est largement répandue dans les élevages bovins, garantissant la qualité sanitaire et biologique de la semence. Différents tests utilisant la cytométrie en flux ont été développés pour mieux caractériser la qualité biologique de la semence et prédire *in vitro* son pouvoir fécondant. Cet essai visait à comparer 2 cytomètres de paillasse (C6 d'Accuri vs 8HT de Millipore) et évaluer leurs performances pour cette application particulière.

Répétabilité et reproductibilité ont été estimées sur des mesures répétées de billes calibrées (Flow check®, Beckmann Coulter) et de paillettes de semence. Pour chaque cytomètre, trois réplicats de 10 éjaculats ont été analysés sur 3 cycles successifs, à partir de trois protocoles visant à déterminer les intensités de fluorescence et les pourcentages de spermatozoïdes i) vivants (SYBR-14 et iodure de propidium, IP), ii) présentant des mitochondries actives (JC-1), iii) présentant un acrosome endommagé (PNA-fitc et IP). Le passage d'une plaque de 96 puits contenant une même suspension de spermatozoïdes marqués avec JC-1 a permis de comparer les passeurs.

Les mesures sur les billes ont montré une faible variabilité de la fluorescence et des paramètres physiques (C6 : 0,3 à 0,4 % ; 8HT : 0,4 à 2,5 %). Les pourcentages de spermatozoïdes estimés à partir des 3 protocoles ont été comparables pour C6 et 8HT respectivement (% vivants 54,2±10,9 vs 51,7±10,5 ; % mitochondries actives : 37,8±9,1 vs 38,3±9,9 ; % intégrité acrosome : 52,1±13,6 vs 51,2±12,8 ; p>0,05), avec des coefficients de variation (CV) peu élevés (Tableau 1). Le conditionnement des passeurs n'a pas modifié les pourcentages moyens de spermatozoïdes avec des mitochondries actives au cours de l'analyse (% respectifs en début et fin de plaque : C6 : 22,7 vs 21,2 ; 8 HT : 37,4 vs 37,1). Cependant, les valeurs moyennes et CV ont différencié entre les appareils (CV de C6 : 17,6 % vs 8HT : 7,0% ; p<0,05). La perte d'intensité de fluorescence entre le début et la fin de la plaque a été plus limitée avec le 8HT qu'avec le C6 (4 % vs 30 %, p<0,05).

.../...



.../...

Tableau 1 : Coefficients de variation moyens des 2 cytomètres selon 3 protocoles appliqués à 10 échantillons de semence bovine

Coefficient de variation	Intra cycle						Inter cycles	
	1		2		3		1+2+3	
Cycle								
Type de cytomètre	8 HT	C6	8 HT	C6	8 HT	C6	8 HT	C6
% vivants	2,6	3,3	2,4	2,9	2,5	3,7	3,2	4,2
% mitochondries actives	3,3	3,9	2,3	4,2	3,1	5,3	4,8	5,9
% intégrité acrosome	2,5	2,9	2,2	3,2	1,7	3,1	2,7	4,2

Les deux cytomètres donnent des résultats proches et fiables pour les protocoles testés et conviennent pour l'évaluation de la qualité de la semence bovine. Les différences observées suite au marquage d'une plaque complète pourraient être liées aux modalités particulières de préparation de la plaque ou au conditionnement du passeur.

Les auteurs remercient les responsables des sociétés ACCURI et IMV/MILLIPORE pour le prêt des cytomètres et leurs conseils techniques.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP1 : HÉMATOLOGIE 1



I-1. PROPOSITION DU GEIL POUR UN PROTOCOLE DE CONSENSUS POUR LA QUANTIFICATION DES PLASMOCYTES: APPLICATION AU DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL ENTRE MGUS ET MYELOME MULTIPLE

Elise Frébet,¹ Julie Abraham,² Franck Geneviève,³ Pascale Lepelley,⁴ Sylvie Daliphard,⁵ Valérie Bardet,⁶ Sophie Amsellem,⁷ Julien Guy,⁸ Francois Mullier,⁹ Françoise Durrieu,¹⁰ Marie-Dominique Venon,¹¹ Xavier Leleu,¹¹ Arnaud Jaccard,² Jean-Luc Faucher,¹ Marie C Béné,¹² and Jean Feuillard,¹ pour le GEIL (Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies).

¹CHU Dupuytren, Laboratoire d'Hématologie, Limoges, France; ²CHU Dupuytren, Service d'Hématologie Clinique, Limoges, France; ³CHU, Laboratoire d'Hématologie, Angers, France; ⁴Laboratoire d'Hématologie, CHU de Lille, France; ⁵CHU Robert Debré, Laboratoire d'Hématologie, Reims, France; ⁶Hôpital Cochin, Service d'Hématologie Biologique, Université Paris Descartes, Paris, France; ⁷Institut Gustave Roussy, Département de Biopathologie, Villejuif, France; ⁸CHU, Service d'Hématologie Biologique, Dijon, France; ⁹Cliniques Universitaires de Mont-Godinne, Laboratoire d'Hématologie, Yvoir, Belgique; ¹⁰Institut Bergonié, Laboratoire d'Hématologie, Bordeaux, France; ¹¹Hôpital Huriez, Service des Maladies du Sang, Lille, France; ¹²CHU de Brabois & Nancy Université, Laboratoire d'Immunologie, Nancy, France

Introduction

La cytométrie en flux est la seule technique disponible pour la quantification de la charge tumorale dans les désordres plasmocytaires monoclonaux. Mais actuellement, il n'existe pas de consensus technique en rapport. Nous rapportons nos résultats quant à une méthode simple et robuste en cytométrie en flux 5 couleurs pour quantifier les plasmocytes (PC) tumoraux dans la moelle, avec une validation multicentrique.

Méthodes

Le marqueur CD36 a été utilisé pour exclure les cellules et les débris de la lignée rouges, les marqueurs CD38 et CD138 pour cibler les plasmocytes, les chaînes légères d'immunoglobuline, les marqueurs CD45, CD56, CD19 et CD117 + CD34 pour simultanément caractériser les plasmocytes anormaux et quantifier les précurseurs hématopoïétiques. Ce protocole a été appliqué dans 9 centres pour 229 cas, incluant 25 contrôles.

Résultats

Les plasmocytes tumoraux ont été détectés dans 96,8% des cas, tous avec un pic d'immunoglobuline sérique supérieur à 1g/L. Le calcul du ratio Plasmocytes/Précurseurs (PC/P) a permis la quantification de la charge tumorale indépendamment de l'hémodilution. Comparé aux autres critères diagnostiques, le ratio PC/P a permis de discriminer les patients avec MGUS ou myélomes avec une sensibilité de 81% et une spécificité de 84%. Le meilleur diagnostic différentiel entre ces deux entités était obtenu en combinant le ratio PC/P avec le pourcentage de plasmocytes anormaux, mais 25% des cas étaient discordants par ces deux critères. La meilleure sensibilité (87%) a été obtenue en calculant indirectement le ratio PC CD19neg/Précurseurs.

Conclusion

Cette méthode standardisée de cytométrie en flux permet la détection et la quantification des plasmocytes tumoraux infiltrant la moelle osseuse dans quasiment tous les cas de MGUS et de myélome, cela indépendamment des débris cellulaires et de l'hémodilution. Cette approche peut être intéressante pour la quantification de la maladie résiduelle dans le myélome



I-2. PROTEINES ABC ET RESISTANCE AUX CHIMIOETHERAPIES DANS LES LAM

*Ollivier Legrand^(1,2) ; Ruoping Tang⁽²⁾ ; Jean-Yves Perrot⁽³⁾ ; Pierre Hirsch^(1,2) ;
Jean-Pierre Marie^(1,2).*

⁽¹⁾ Département d'hématologie hôpital Saint-Antoine, APHP ; Paris

⁽²⁾ Laboratoire INSERM

⁽³⁾ Laboratoire d'hématologie hôpital Saint-Antoine

Les protéines ABC (ATP Binding cassette) sont une famille de protéines intervenant dans les mécanismes de résistance aux chimiothérapies dans les leucémies aiguës myéloblastiques ainsi que des marqueurs de cellules souches hématopoïétiques. Elles sont 49 dans l'espèce humaine. Celle qui a été le plus étudiée est ABCB1 (Pgp, MDR1). L'étude de son expression/fonctionnalité peut se faire par différentes techniques, PCR ou cytométrie en flux principalement. En cytométrie l'expression et la fonctionnalité peuvent être étudiées par différents anticorps monoclonaux et pour leur fonctionnalité par différentes sondes et modulateurs. De plus l'expression d'autres protéines ABC ont montré pouvoir intervenir dans la chimiorésistance des LAM ou au moins être de solides facteurs pronostiques, comme ABCC1, ABCG2, et plus récemment ABCG1, et probablement d'autres.

Nous revoyons ici les différentes techniques utilisées pour la détection de ces gènes/protéines ABC, et l'intérêt de l'étude de l'ensemble des ABC chez les patients atteints de LAM, ainsi que l'utilité de leur modulation en clinique avec les données publiées récemment.



II – Communications sélectionnées :

II-1. DEGRE DE MATURATION DES BLASTES DE LEUCEMIE MYELOBLASTIQUE SELON L'EXPRESSION DE CD90 ET CD133

L Rigollet (1), F Solly (1), L Campos-Guyotat (1)

(1) Laboratoire d'hématologie, Hôpital Nord, St Etienne

Nos précédents travaux ont montré que dans certains cas de leucémie aiguë myéloblastique (LAM), les blastes exprimaient les marqueurs de cellules-souches CD90 et CD133. CD90 était exprimé dans environ 2/3 des cas, avec une expression faible et généralement limitée aux blastes CD34-. CD133 était retrouvé dans 40 à 70% des cas selon le seuil utilisé, préférentiellement sur les blastes CD34+. L'expression de ces marqueurs, en particulier CD133, était associée aux LAM de pronostic péjoratif. Cela nous a amené à étudier le degré d'immaturité de ces blastes CD90+ et/ou CD133+. Nous avons analysé 12 cas de LAM exprimant CD90 et/ou CD133 en cytométrie de flux 6 couleurs (CantoII BD). La combinaison utilisée était CD38-FITC / CD90-PE / CD45-PerCPCy5.5 / CD34-PE-Cy7 / CD133-APC / HLA-DR-APC-Cy7.

Dans 4 cas on isole deux populations blastiques distinctes CD90+/CD133- et CD90-/CD133+ mutuellement exclusives. Le cytogramme CD34/CD38 montre très nettement un chemin de maturation avec une perte du CD133 et du CD34 en parallèle de l'acquisition du CD90, du CD38 et du HLA-DR. Dans les trois cas exprimant CD133 sans CD90 la population blastique est immature CD34+, CD38- ou faible, DR+ ou DR-. Au contraire les 3 cas CD90+/CD133- montrent un profil plus mature des blastes CD34+/CD38+/DR+. Une coexpression de CD90 et CD133 est présente dans deux cas : une partie des blastes CD133+ expriment conjointement CD90 (il n'y a pas de blastes CD133-/CD90+). On ne met pas en évidence de différence d'expression pour le DR, le CD34 ou le CD38 entre les populations CD133+/CD90+ et CD133+/CD90- chez ces deux patients.

Nos résultats mettent en évidence un chemin de maturation au sein des blastes de LAM : CD133 est présent sur les populations blastiques les plus immatures (CD34+/ CD38-/DR- ou faible). CD90 apparaît à un stade plus mature, sur des cellules généralement CD34+ (ou plus rarement CD34-)/CD38+/DR+ (voir figure 1). Ce schéma de maturation est conservé dans les cas avec deux sous-populations distinctes CD90+ et CD133+. Dans les rares cas de co-expression CD90/CD133, le caractère immature des blastes CD133+ prédomine.

CD133 est un marqueur bien connu dans plusieurs types de cellules-souches cancéreuses et normales ; nous montrons ici que dans le contexte des LAM, comme pour d'autres types de cancers, son expression est associée à une plus grande immaturité des cellules tumorales. Ce caractère plus immature des blastes exprimant CD133 pourrait expliquer pourquoi ce marqueur est retrouvé surtout dans les LAM de pronostic défavorable.

.../...



.../...

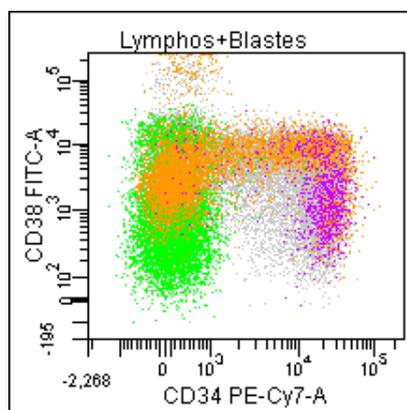


Figure 1 : exemple représentatif du chemin de maturation des blastes

Vert : lymphocytes ; orange : blastes CD90+ ; rose : blastes CD133+, gris : blastes CD90- /CD133-



II-2. MISE EN PLACE ET AMÉLIORATION DU PROTOCOLE D'OGATA POUR LE DIAGNOSTIC PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES MYELODYSPLASIES

E. Guérin¹, M.-P. Gourin², P. Cecco¹, D. Bordessoule², J. Feuillard¹

1 Laboratoire d'Hématologie UMR CNRS 6101, CHU Limoges

2 Service d'Hématologie Clinique, CHU Limoges

Introduction :

Lors de l'évaluation initiale des myélodysplasies (MDS) de bas grade, la cytologie est souvent l'unique critère diagnostique, la cytogénétique étant rarement contributive. En l'absence de marqueurs spécifiques (excès de blastes, anomalies cytogénétiques, sidéroblastes en couronne) et d'anomalies cytologiques évidentes, le diagnostic différentiel avec des dysplasies réactionnelles se révèle difficile et nécessite la prise en charge globale du patient avec son suivi prolongé. La CMF, recommandé par la WHO, peut être une aide diagnostic.

Objectif :

Nous avons adapté une technique simple de marquage en 3 couleurs (CD34, CD45, CD10) testée sur deux cohortes japonaises et italiennes (Ogata, Haematologica 2009). Pour sensibiliser la détection des progéniteurs B, le CD19 a été ajouté, puis le CD5, CD7 et CD56.

Méthode :

97 prélèvements médullaires ont été testés : 34 MDS ou MDS/SMP prouvées (dont 16 sans excès de blastes), 33 patients contrôles (3 sujets sains, 30 cytopénies non clonales), et 30 suspicions de MDS avec des données insuffisantes pour affirmer le diagnostic. Les échantillons ont été traités dans un délai inférieur à 16 heures. Les cellules nucléées ont été marquées avec du 45-FITC, CD10-PE, CD19-PC5 et CD34-PC7. Un minimum de 100000 cellules a été analysé. 4 paramètres ont été étudiés: (1) le pourcentage de précurseurs myéloïdes parmi l'ensemble des cellules nucléées (norme <2.4%); (2) le pourcentage de progéniteurs B parmi les CD34+ (norme >5%); (3) le ratio du mean de fluorescence du CD45 des précurseurs myéloïdes et des lymphocytes (norme =4-7.8); (4) l'hypogranularité des précurseurs granuleux CD10-, évalué par le SS peak channel ratio par rapport aux lymphocytes (norme >6). Un point est attribué pour chaque paramètre en dehors des normales.

Resultats :

4 patients contrôles ont un score à 2, et parmi les MDS prouvées 24/34 ont un score supérieur ou égal à 2 (spécificité = 89% et sensibilité =71%). Si on regarde la cohorte de patients sans excès de blastes (2 perls positifs et 2 caryotypes anormaux), la sensibilité est de 58%. 20% des patients avec suspicion de MDS ont un score supérieur à 2. De façon intéressante, les paramètres les plus souvent anormaux sont le SS peak et la proportion de progéniteurs B. Devant ces résultats encourageants, la combinaison a été étendue pour détecter le CD5, CD7 sur les blastes et le CD56 sur les monocytes. Nous en présenterons les premiers résultats.

Conclusion :

Le score d'Ogata est simple, facile à mettre en place en routine et aisément appréhendable par les cliniciens. Les suspicions de MDS devront être réévaluées dans le temps. Les sensibilités et spécificités sont comparables à celles publiées sans modification des valeurs de référence. Par conséquent, l'évaluation de la proportion progéniteur B et myéloblastes-CD34+ associée à une évaluation cytométrique de la dysplasie apparaît reproductible entre les laboratoires. L'extension de la combinaison avec les marqueurs CD5, CD7 et CD56 devrait permettre de reconnaître les anomalies phénotypiques les plus significatives sur les blastes et les monocytes.



II-3. VALIDATION DE LA QUANTIFICATION DE L'HÉMORRAGIE FOETOMATERNELLE EN CYTOMÉTRIE EN FLUX PAR LE KIT FMH *QuikQuant* TRILLIUM DIAGNOSTICS/BECKMAN COULTER

C Pastoret, T Fest, M Roussel

Laboratoire Hématologie, Pole de Biologie, CHU Pontchaillou, Rennes

Introduction :

Le test de Kleihauer (TK), basé sur la différence de solubilité en milieu acide entre l'hémoglobine fœtale et adulte, consiste en une quantification microscopique des hématies fœtales (HF) dans le sang maternel. Bien que peu reproductible et subjectif, le TK reste le test de référence utilisé pour l'adaptation des doses d'immunoglobuline anti-Rhésus D dans la prévention de l'allo-immunisation foetomaternelle. Nous avons évalué le kit FMH *QuikQuant* permettant la quantification des HF en cytométrie en flux (CMF).

Méthode :

132 échantillons ont été testés en parallèle en CMF et en microscopie. 76 prélèvements de patientes des urgences gynécologiques, 5 sangs de cordon dilués dans du sang d'adulte (1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 et 1/10000 réalisés en double) et 6 échantillons correspondant aux trois niveaux de contrôles ont été inclus dans cette étude.

La technique de CMF est basée sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-Hémoglobine F en marquage direct associé à de l'iodure de propidium permettant d'exclure les éléments nucléés. 100000 hématies ont été analysées sur un cytomètre Navios (BeckmanCoulter). Les résultats ont été rendus, dans les 2 techniques, en hématies fœtales contre 10000 hématies maternelles.

Résultats :

Sur les 50 dilutions de sangs de cordons, la quantification des HF en CMF montre une excellente corrélation avec le nombre d'HF attendues (r de Spearman à 0,977 (intervalle de confiance à 95% (IC95%) 0,957-0,987) et un coefficient de variation inférieur à 20% pour des valeurs comprises entre 5 et 10 HF pour 10000 hématies maternelles. Le TK retrouve également une bonne corrélation avec les valeurs attendues ($r=0,946$; IC95% 0,940-0,970), en revanche, on note une dispersion importante avec des coefficients de variation de 43% à 29% respectivement pour les dilutions de 1/10000 à 1/100.

Sur l'ensemble des 132 échantillons (patientes et dilutions), la CMF est bien corrélée au TK ($r=0,861$; IC95% 0,807-0,900) malgré la surestimation systématique de la microscopie (à partir de 5/10000 hématies) avec un biais de 26,4% (déviation standard de 65,2%) établi par le test de Bland-Altman.

Pour l'ensemble des résultats microscopiques négatifs (TK-) ($n=71$), la quantification des HF en CMF est inférieure à 5 pour 10000. Trois des patientes ont un TK positif confirmé par la CMF. Des discordances (TK+/CMF-) sont retrouvées pour deux patientes : 1 cas est identifié comme un faux positif du TK par 2 tests de contrôles retrouvés négatifs ; l'autre semble être un faux négatif de la CMF non expliqué. Cependant sur 30 dilutions TK+ aucune n'était négative en CMF.

Les deux méthodes sont concordantes dans 98,4% des échantillons testés.

.../...



.../...

Conclusion

La quantification de l'hémorragie foetomaternelle en CMF par le kit FMH *QuikQuant* : *i*) est réalisable en 1h30 pour une série de 10 échantillons ; *ii*) est corrélée à la méthode de référence mais est plus reproductible et fiable avec un seuil de positivité à 5% malgré la réalisation technique par différents opérateurs. Par ailleurs ce seuil est cliniquement pertinent pour l'adaptation des doses d'immunoglobuline anti-RhD dans la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle ; *iii*) permettrait d'éviter une surestimation systématique vue avec TK et conduisant probablement à des surtraitements.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP2 : IMAGERIE



SP2 - IMAGERIE (ANGLAIS)

I – Orateurs prévus

I -1. ONE MOLECULE AT A TIME: FROM SUPER-RESOLUTION IMAGING TO SINGLE PARTICLE TRACKING OF NUCLEAR FACTORS

Yzeddin Ignacio

Progress in optical microscopy, combined to the emergence of new fluorescent probes and advanced instrumentation, now permits the imaging of single molecules in fixed and live cells. This extreme detection sensitivity has opened new modalities in cellular imaging. On the one hand, optical images with an unprecedented resolution in the 10-50 nm range, well below the diffraction limit of light, can be recorded. These super-resolution images give new insights into the properties of cellular structures. On the other hand, proteins, either in the membrane or intracellular, can be tracked in live cells and in physiological conditions. Their individual trajectories provide invaluable information on the molecular interactions that control their dynamics and their spatial organization. Single molecule imaging is rapidly becoming a unique tool to understand the biochemical and biophysical processes that determine the properties of molecular assemblies in a cellular context.

We explored new conditions of single particle tracking using photoactivated localization microscopy that enables the study of protein dynamics inside live eukaryotic cells. Applying this method to several nuclear proteins, we captured the wide range of diffusive behaviors from very rapid diffusion ($\sim 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$) for the free fluorophore Dendra2, to anomalous or corralled motion for transcription factors such as the P-TEFb, c-Myc and the Fibrillarin, and the bound states of H2B histone proteins. Our results suggest that nuclear exploration is not governed solely by the nucleoplasmic geometry, but also by the nature of the protein interactions. This approach opens the road to single-molecule biochemical studies inside living eukaryotic cells.



I-2. NUCLEAR DYNAMICS IN THE CONTEXT OF LAMINOPATHIES

W.H. De Vos⁽¹⁾, *A. Malhas*⁽²⁾, *D. Vaux*⁽²⁾, *F. Ramaekers*⁽³⁾ & *J. Broers*⁽³⁾

⁽¹⁾ Bio-imaging and Cytometry Unit, Ghent University, Belgium; ⁽²⁾ Sir William Dunn School of Pathology, Oxford University, UK; ⁽³⁾ Dept. Molecular Cell Biology, Maastricht University Medical Center, The Netherlands; (winnok.devos@ugent.be).

The nuclear lamina provides structural support to the nucleus and has a central role in nuclear organization and gene regulation. Defects in its constituents, the lamins, lead to a class of genetic diseases collectively referred to as laminopathies. Using live cell imaging and high content image cytometry, we quantitatively compared multilevel nuclear dynamics in dermal fibroblast cultures of patients with different mutations of lamin A/C. We thereby distinguished varying levels of nuclear plasticity and different regimes of telomere mobility [1]. In addition, we observed the frequent occurrence of intermittent, non-lethal ruptures of the nuclear envelope in patient cells [2]. These ruptures, which were absent in normal fibroblasts, could be mimicked by selective knockdown of lamin A/C and were accompanied by the loss of nuclear compartmentalization. This was demonstrated by the efflux of nuclear regulatory proteins and complexes and resulted in downstream effects on stress-responsive gene expression. Since this phenomenon was observed in all laminopathy variants examined, albeit with varying severity, our data suggest that loss of compartmentalization may be a common denominator for the plethora of laminopathy phenotypes.

[1] De Vos et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010

[2] De Vos et al., *Human Molecular Genetics*, 2011

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP3 : APOPTOSE



I-1. FROM THE STUDY OF APOPTOSIS INHIBITION DUE TO CARDIOLIPIN DEFICIENCY TO GIANT UNILAMELLAR VESICLES MIMETIC OF MITOCHONDRIAL CONTACT SITES : A WALK WITH CYTOMETRY

Patrice X. Petit

Institut Cochin, Département d'Immuno-Hématologie, CNRS UMR 8104, Paris, France.

Cardiolipin is a mitochondria-specific phospholipid known to glue respiratory chain complexes together thus favorizing their work at full yield, as well as to mediating key steps in apoptosis. The Barth syndrome, a X-linked cardiomyopathy, is one of the very rare model where cardiolipins are affected (associating low amounts of CL to a default of maturation of the acyl chains resulting in Monolysocardiolipin accumulation) as a result of tafazzin gene mutations.

Using Barth syndrome patient-derived lymphoblasts, we show that abnormal cardiolipin leads to mitochondrial dysfunction that appeared to be efficiently compensated (increase of mitochondrial size and citrate synthase activity). We also confirmed that the mitochondrially mediated type II apoptosis is altered in all its dimensions, by an extensive multiparametric flow cytometric analysis of apoptosis and that the blockade layed at the mitochondrial level.

Indeed, the mitochondrially induced apoptosis by Fas is totally inhibited at the mitochondrial contact site level when tafazzin is affected whatever the mutations are. Cardiolipin (CL) has recently been shown to provide an anchor and an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria (1). We hypothesize that this platform may assemble at mitochondrial contact sites, at which cardiolipin and tBid have been detected. CL may anchor caspase-8 between the inner and outer membrane at contact sites, facilitating its self-activation, Bid full-length cleavage, tBid generation, mitochondrial destabilization, Bax delocalization and apoptosis execution. In this study, we made use of an "in vitro" system mimicking the mitochondrial membrane contact site platform. We reconstituted caspase-8, Bid-FL and cardiolipin in Giant Unilamellar Vesicles (GUVs). We analyzed these vesicles with a newly developed flow cytometry approach (2), confocal microscopy and other biophysical approaches and determined the minimal requirements and basis of platform formation and functional activity. The role of this newly defined platform in apoptosis activation opens up new possibilities in studies of the pathogenesis of human diseases associated with cardiolipin dismetabolism, including the X-linked cardiomyopathy known as Barth syndrome.

(1) Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. Gonzalez F, Schug ZT, Houtkooper RH, MacKenzie ED, Brooks DG, Wanders RJ, Petit PX, Vaz FM, Gottlieb E. *J Cell Biol.* 2008 Nov 17;183(4):681-96.

(2) Giant unilamellar vesicles (GUVs) as a new tool for analysis of caspase-8/Bid-FL complex binding to cardiolipin and its functional activity

O Jalmar, AJ Garcia-Saez, L Berland, F Gonzalez and PX Petit

Cell Death and Disease (2010) 1, e103.



I-2. UN FLUX CALCIQUE ENTRE LE RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE ET LA MITOCHONDRIE CONTRIBUE À L'APOPTOSE INDUITE PAR LE POLIOVIRUS

C. Brisac^(1,2,3), F. Téoulé^(1,2,3), A. Autret⁽¹⁾, I. Pelletier^(1,2), F. Colbère-Garapin^(1,2),
C. Brenner^(3,4), C. Lemaire^(3,4) et B. Blondel^(1,2).

⁽¹⁾ Institut Pasteur, Biologie des Virus Entériques, Paris; ⁽²⁾ INSERM U994, Paris;

⁽³⁾ Université Versailles Saint-Quentin, Versailles; ⁽⁴⁾ INSERM U769, Châtenay Malabry;
(bruno.blondel@pasteur.fr).

Le poliovirus (PV), un *Entérovirus* de la famille des *Picornaviridae*, est l'agent étiologique de la Poliomyélite Paralytique Aiguë (PPA). La PPA se caractérise par des paralysies flasques dues à la destruction des neurones moteurs de la moelle épinière suite à la réplication du PV. Dans un modèle murin, il a été montré que les neurones moteurs infectés par le PV meurent par un processus apoptotique (Girard *et al.*, J. Virol., 1999). L'apoptose induite par le PV implique un dysfonctionnement mitochondrial caractérisé notamment par la chute du potentiel membranaire de la mitochondrie ($\Delta\psi_m$) et la libération du cytochrome c dans le cytosol (Blondel *et al.*, Front. Biosci. 2009).

Nous avons fait l'hypothèse que l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique ($[Ca^{2+}]_c$) décrite par Irurzun *et al.* (J. Virol., 1995), suite à l'infection par le PV, pourrait jouer un rôle dans l'induction du dysfonctionnement mitochondrial.

Dans cette étude, nous avons montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ induite par le PV dans des cellules neuronales humaines (cellules de neuroblastome IMR5) est due, au moins en partie, à une libération de Ca^{2+} depuis la lumière du réticulum endoplasmique (RE) vers le cytosol à travers les canaux calciques du récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3R) et du récepteur à la ryanodine (RyR). Ceci conduit à l'accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie via le canal anionique dépendant du voltage (VDAC) et le canal calcique uniporteur. Les conséquences majeures de l'élévation de la concentration de Ca^{2+} mitochondrial dans les cellules infectées par le PV sont l'induction du dysfonctionnement mitochondrial (chute du $\Delta\psi_m$ et libération du cytochrome c) et l'apoptose (fragmentation de l'ADN) (Brisac *et al.*, J. Virol. 2010).

Dans les cellules neuronales infectées par le PV, un flux calcique entre le RE et la mitochondrie contribue donc à la mort cellulaire et pourrait par conséquent jouer un rôle dans la pathogenèse de la poliomyélite.



II-1 L'INFECTION PAR LE VIH/VIS SENSIBILISE LES MONOCYTES ET LES CELLULES DENDRITIQUES À L'APOPTOSE.

Campillo-Gimenez L1, Laforge M2, Monceaux V, Cumont MC, Hurtrel B, Corbeil J, Zaunders J, Elbim C1 and Estaquier J2.

(1) UMRS 945, Hôpital la Pitié Salpêtrière, Paris, France. (2) U955, IMRB, Faculté de médecine, Créteil, France.

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) – monocytes/macrophages et cellules dendritiques (DC) – ont un rôle majeur dans la mise en place des réponses innées et adaptatives nécessaires aux défenses de l'hôte contre les agents pathogènes. Ainsi des dysfonctions ou une mort prématurée de ces cellules par apoptose peuvent moduler les réponses immunes et donc l'équilibre hôte/pathogènes. Nous avons montré, lors de la différenciation, *in vitro*, des macrophages et DC à partir de monocytes, que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sensibilise ces cellules à l'apoptose en réponse, respectivement, aux ligands de mort TRAIL et FasL. L'augmentation de l'apoptose induite par le VIH est confirmée par une augmentation de l'expression des molécules pro-apoptotiques Bax et Bak, associée à une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques FLIP et Mcl-1. Afin de valider la relevance de ces observations dans un contexte expérimental de l'infection par le VIH, nous avons étudié la mort par apoptose des CPA au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) chez des singes pathogènes rhésus macaque (RM). Nous démontrons alors une augmentation de l'apoptose des monocytes (CD14+) et des DC du sang périphérique au cours de la phase aigüe de l'infection par le VIS, associée à une dérégulation de la balance des molécules pro et anti-apoptotiques. L'utilisation d'un inhibiteur de caspases ou d'antagonistes des récepteurs de mort permet de prévenir, *ex vivo*, l'apoptose des CPA. De plus, une augmentation du taux plasmatique du ligand de mort FasL, est mesurée chez les singes RM comparé aux singes non pathogènes pour l'infection.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc une apoptose inappropriée des CPA pouvant contribuer aux perturbations des réponses immunitaires préalablement décrites au cours de l'infection par le VIH/VIS et ce dès la primo-infection.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP4 : CANCÉROLOGIE



I-1. EXPLORING THE NEUROBLASTOMA EPIGENOME: PERSPECTIVES FOR THE DISCOVERY OF PROGNOSTIC BIOMARKERS

M. Ongenaert, A. Decock, J. Vandesompele, F. Speleman

Center for Medical Genetics, Ghent University, Ghent, Belgium (mate.ongenaert@ugent.be)

Neuroblastoma (NB) is a childhood tumor originating from sympathetic nervous system cells. Although recently new insights into genes involved in NB have emerged, the molecular basis of neuroblastoma development and progression still remains poorly understood. The best-characterized genetic alterations include amplification of the proto-oncogene MYCN, ALK activating mutations or amplification, gain of chromosome arm 17q and losses of 1p, 3p, and 11q. Epigenetic alterations have been described as well: caspase-8 (CASP8) and RAS-association domain family 1 isoform A (RASSF1A) DNA-methylation are important events for the development and progression of neuroblastoma. In total, there are about 75 genes described as epigenetically affected in NB cell lines and/or NB primary samples.

Most of these methylation markers are found using 'candidate gene' approaches and the methylation frequencies are usually very low. In order to find novel methylation markers that can be used for improved prognosis, we applied a whole-genome methylation screen. This technique relies on capturing with the MBD2 protein, containing a methyl-binding domain (MBD), with a very high affinity towards methylated genomic regions. In an initial phase, MBD2-seq was performed on 8 NB cell lines (where we also had micro-array data of, before and after treatment with DAC). As these results are promising, we will explore the complete methylomes of 45 primary NB tumors.

Based on an integrative analysis (re-expression results, expression micro-arrays, MBD2-sequencing on cell lines), 48 MSP (Methylation Specific PCR) assays were tested on 89 primary neuroblastoma patients of different risk categories. The results of this validation study demonstrate the power of epigenetic biomarkers as several assays are informative for prognosis and survival.



I-2. THE GENETIC COMPLEXITY OF RENAL CANCER CELLS

Serena Germano¹, Charlotte Gueydan¹, Manja Neumann², Maren Scharfenberger³, Geraldine Cancel-Tassin¹, Eva Comperat⁴, Olivier Cussenot¹, Gilles Thomas⁵, Richard Gabriel⁶, Manfred Schmidt⁶, Adam Dupuy⁷, Holger Moch⁸, Juergen Serth⁹, Christof von Kalle⁶, Felix Niggli¹⁰, and Robert Koesters¹

¹Hopital Tenon, Paris, France, ²Institute of Human Genetics, University of Heidelberg, Germany

³DKFZ, Heidelberg, Germany, ⁴Department of Pathology, Pitie-Salpetriere Hospital, Paris, France, ⁵Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Department Health and Human Services, Bethesda, Maryland, USA, ⁶NCT, Heidelberg, Germany, ⁷Department of Anatomy & Cell Biology, Carver College of Medicine, University of Iowa, ⁸University Hospital, University of Zurich, Switzerland, ⁹MHH, Hannover, Germany, ¹⁰Children's Hospital, University of Zurich, Switzerland (Robert.koesters@upmc.fr)

Renal cancer takes the third place in incidence among urologic tumors shortly following prostate and bladder cancer. Renal cancer is, however, the worst in cancer-specific mortality, since more than 40% of the patients die of this disease. In France about 10 000 new cases of renal cancer are diagnosed every year and the incidence is steadily increasing. Renal cancer – like any other cancer - has been primarily regarded as a genetic disease in which stepwise accumulation of genetic defects, clonal amplification and selection of affected cells ultimately lead to invasive cancer. About six to ten different genes are supposed to be mutated in any given tumor. Only some of the affected genes are mutated frequently, like WT1 and CTNNB1 in childhood renal cancer or VHL and PBRM1 in adult renal cancer, whereas most other mutations affect hundreds of different genes in different tumors. This unforeseen genetic complexity translates into the biological heterogeneity commonly seen in renal cancer and which is the reason why progression, recurrence, and treatment response are still unpredictable.

We use "Sleeping Beauty", a novel and elegant method for the genome-wide identification of cancer genes. By somatic activation of oncogenic transposons, insertional mutagenesis causes tumor formation in transgenic mice. Integration occurs at random but cancer-causing insertions are amplified in tumor cells by clonal selection. Based on the known and invariant DNA sequence of the transposon the integration sites can be directly amplified by ligation-mediated PCR. Sequencing, then, identifies the genomic DNA immediately flanking the integration site. This leads to the rapid identification of affected genes. We have analyzed the transposon integration sites of ≈ 100 mouse renal cell carcinomas and have established a total number of 275 000 single reads (unique integrations plus replica) among them 75 000 unique hits in the mouse genome. The integration sites were evenly distributed among all chromosomes and we found significant hits (non-random integration) in a total number of 120 genes ($10^{-100} < p < 10^{-5}$), among them eight known human renal cancer genes. Ongoing work aims at evaluating the functional role of the 120 candidate genes in human renal cancer. Our findings demonstrate that Sleeping Beauty can be successfully used to identify primary renal cancer genes with relevance to human disease.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP5 : MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE



I-1. APPORTS DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX DANS LE DÉVELOPPEMENT ET LE SUIVI DE PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE VACCINS

C. Sellin, C. Borovsek-Droy, N. Callaert, F. Calvosa-Enderli, E. Calvosa, J-M Guillaume.

Sanofi Pasteur, Bioprocess R&D, Upstream, Unité de Culture Cellulaire et Virale, Marcy l'étoile ; caroline.sellin@sanofipasteur.com

Dans le cadre du développement d'un procédé de production de vaccin, la cytométrie en flux est un outil de choix. Cette technologie permet de suivre l'état physiologique du substrat cellulaire (taille FSC, granularité SSC, mesure de l'apoptose, analyse du cycle cellulaire ...) et de s'assurer à chaque étape du développement de procédé de la quantité d'antigène produit via un marquage avec un anticorps spécifique fluorescent.

Cette communication se concentrera sur ce deuxième aspect de l'utilisation de la cytométrie en flux.

Pour les antigènes protéiques, différents substrats cellulaires peuvent être utilisés, que ce soit des bactéries ou des cellules de mammifères. L'exemple présenté concerne le développement d'un procédé de production de protéine recombinante sur cellules de hamster. La première étape du développement du procédé de production a consisté à trier les lignées cellulaires transfectées. Grâce à une immuno-détection de l'antigène par cytométrie, il a été possible de sélectionner les lignées les plus productives, car l'intensité de fluorescence du marquage est corrélée à la quantité d'antigène produit, détectée par ELISA. Ce même marquage a ensuite permis de définir les meilleurs paramètres de culture : pH, température, milieu de culture ... et ainsi de définir un procédé performant. Enfin, le marquage de l'antigène a permis de suivre la stabilité de la lignée, une fois celle-ci choisie, aux différents stades de production.

Pour les procédés de production de vaccin viral, la cytométrie en flux permet de suivre le niveau d'infection des cellules. L'exemple présenté concerne le développement de procédé d'un vaccin rabique. Son substrat cellulaire est cultivé de façon dynamique sur micros supports, suivant un procédé multi-récolte. Dans le cadre de l'amélioration du procédé de production, un suivi de la cinétique d'infection par cytométrie en flux a été mis en place suivant les différentes conditions de culture. Pour cela, les cellules sont marquées à différents temps post-infection avec un anticorps dirigé contre une protéine d'enveloppe. Le pourcentage de cellules infectées, ainsi que l'intensité de fluorescence moyenne, sont mesurés. Ces données sont corrélées au titre en antigène, tel que mesuré par ELISA ou HTRF. La détermination en temps réel de la cinétique d'infection et de l'intensité de fluorescence permet de définir et d'extrapoler les paramètres permettant une augmentation de productivité du procédé de production. Des analyses en microscopie électronique à balayage confirment les données expérimentales.

Au delà de la définition de procédés, l'analyse en cytométrie de la cinétique d'infection est aussi utilisée pour le suivi des productions afin de détecter ou anticiper des anomalies de productivité. Cette analyse possède l'avantage d'être plus rapide que les méthodes de titrage antigénique classique telles que l'ELISA, et de permettre d'acquérir une bonne connaissance du procédé au niveau cellulaire. La rapidité de réponse permet ainsi d'intervenir rapidement sur les fabrications en cours.



I-2. A NEW TOOL TO ENUMERATE AND ANALYSE ACTIVITY OF *BIFIDOBACTERIUM* IN DAIRY PRODUCT BASED ON FLOW CYTOMETRY

*J. Geng, K. Bertrand, J. Combrisson**

Analytical Sciences, Danone Research, RD 128, Palaiseau 91767
(jerome.combrisson@danone.com)

Introduction: Before dairy fermentation, the quality of starter culture is controlled with classical enumeration method (CFU) which is time consuming and can only provide information of cultivable bacteria. The aim of our study was to develop a flow cytometry (FCM) method for rapid and accurate analysis of *Bifidobacterium*.

Method: By combining different fluorescent probes with flow cytometry, it allows simultaneous measurements of viability and different metabolic activities: we used propidium iodide (PI) and SYTO 24 to measure membrane integrity; 3,3'-diethyloxycarbocyanine iodide (DiOC2(3)) is used to monitor membrane potential; Carboxyfluorescein diacetate (cFDA) are for estimation of esterase activity and respiratory activity. Finally the performances of our FCM method were compared with classical culture-based enumeration (ISO 29981- IDF220) on *Bifidobacterium* starter culture.

Results and Conclusion: Results showed that overnight *Bifidobacterium* starter culture was active in membrane potential and esterases activity, which indicate a good physiological status. The population of active cells obtained in FCM method was in accordance with the number of cultivable cells in ISO enumeration method. This multiparametric FCM approach provides rapid assessment of the viability and physiological activities of *Bifidobacterium* in situ (1 hour for FCM vs 3 days for CFU). Further work is to adapt and apply this method on a mixture of different bacterial strains by using relative antibody.

Keywords: Dairy; *Bifidobacterium*; Rapid method



II.1 ENHANCEMENT OF VIABILITY OF *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB12 DURING STORAGE IN ORGANIC FERMENTED MILK IS RELATED TO BACTERIAL FATTY ACIDS MEMBRANE

Ana Carolina Florence^{1,2}, *Marielle Bouix*², *Maricê Nogueira de Oliveira*¹ and *Catherine Béal*²

¹ FCF - USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo. SP, Brasil;

² AgroParisTech, INRA CBAI, Thiverval-Grignon, France, (acflorence@grignon.inra.fr)

The development of organic probiotic fermented products is of great interest as they associate the benefits of both organic milk and bifidobacteria. As organic milk is characterized by a specific fatty acid composition (trans-vaccenic, conjugated linoleic and alpha-linolenic fatty acids), we intend to investigate the effect of type of milk (organic or conventional) on survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12. Acidification activity (Cinac system), cultivability (plate counts), viability (epifluorescence detected by flow cytometry) and membrane fatty acid composition (gas chromatography) were measured and compared after fermentation and after 21 days of storage at 4°C.

Acidification activity was slightly higher in organic milk as compared to conventional milk, which displayed 30 min longer acidification duration. From cultivability measurements, the survival was improved in organic milk after 21 days of storage in 23%. The viability decreased during storage, but a less pronounced reduction of viable cells was observed in organic fermented milks (from 62±5.8% to 40±2.0% instead of 63%±7.2 to 32±2.7% in conventional milk). Analyses of fatty acid membrane composition revealed differences between the cells grown in organic and conventional milks. Higher amounts of stearic (C18:0), oleic (C18:1) and linoleic (C18:2) acids were found in cells from conventional milk whereas higher levels of myristic (C14:0), pentadecanoic (C15:0) and alpha-linolenic (C18:3-ALA) acids were detected in cells from organic milk.

It was interesting to notice that this fatty acid was only present in organic fermented milk. Moreover, variations in membrane fatty acids composition were revealed during storage, with a significant increase in ALA content in organic milk. From our results, it was concluded that the higher levels of ALA contributed to improve survival of *Bifidobacterium* BB12 during chilled storage in organic milk.

Finally, we suggest that a positive relationship exists between the fatty acid composition of the milk and the survival of the bifidobacteria in fermented milks.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP6 : NEUROBIOLOGIE



I-1. CONVERGENCE ET SEGREGATION DES TERRITOIRES DE PROJECTIONS STRIATAL DU CORTEX PREFRONTAL. ANALYSE TRI-DIMENSIONNELLE COMPARATIVE ENTRE LE RAT ET LE SINGE

Philippe Mailly

Universite Pierre et Marie Curie, PARIS

Jean-Michel Deniau, Véréna Aliane, Suzanne Haber, Marie-Lou Kemel,

philippe.mailly@snv.jussieu.fr

Les connexions préfronto-striatales sont un élément clé dans le réseau neuronal qui sous-tend la prise de décision. Ce réseau est essentiel pour l'apprentissage basé sur incitation permettant la formation, l'exécution et la mise à jour des routines de comportement. Des données anatomiques récentes chez le singe en utilisant une nouvelle approche de reconstruction en trois dimensions (3D) ont révélé des caractéristiques spécifiques aux projections préfronto-striatales. Les résultats ont montré deux types de projections: un réseau focal dense des champs de projection et une projection diffuse, s'étendant sur une vaste zone du striatum. Par ailleurs, les fibres provenant de différentes aires corticales fonctionnelles occupent des territoires distincts et convergents. Par conséquent, outre la topographie bien décrite que soutient le concept de circuits parallèles cortico-striataux, la convergence fournit la preuve de l'intégration entre les circuits. En particulier, les projections très étendues du cortex cingulaire antérieur recouvrent les champs terminaux ventro-médiaux et dorso-latérales des aires préfrontales, ainsi qu'avec les régions orbito-frontales prémotrices suggérant un rôle pivot du striatum pour intégrer les mécanismes de récompense et de cognition dans l'apprentissage des comportements.

En utilisant des injections de traceur antérograde (PHA-L) et des reconstructions 3D, nous avons examiné l'organisation des champs terminaux cortico-striataux en provenance de subdivisions fonctionnelles du cortex préfrontal chez le rat. Les résultats ont démontré que (1) les champs de projection comprenaient une zone dense de terminaisons (projection focale) entourée par des zones de projections diffuses; (2) les chevauchements ainsi que les ségrégations apparaissent entre les projections focales; (3) les projections diffuses issues des aires corticales cingulaire antérieur et prélimbique sont particulièrement étendues dans la partie dorso-rostrale du striatum et s'interfacent avec les champs terminaux des aires du cortex orbitaire, insulaire et médio-central pré-moteur. Ces données mettent en évidence les principes communs d'organisation des projections préfronto-striatales partagés par le rat et le singe ainsi que le rôle du striatum dans l'intégration des mécanismes de récompense d'affect et des processus cognitifs.



I-2. MARQUEURS COMBINATOIRES POUR SUIVRE LE LIGNAGE CELLULAIRE ET LA CIRCUITERIE NEURONALE

K. Loulier⁽¹⁾, R. Barry⁽¹⁾, K. Matho⁽¹⁾, D. Mou, M. Zhang, S. Fouquet⁽¹⁾, S. Turney⁽²⁾, J.W. Lichtman⁽²⁾, J. Livet⁽¹⁾,

⁽¹⁾ Institut de la Vision, INSERM UMRS_968, UPMC 75012 Paris (jean.livet@inserm.fr);

⁽²⁾ Center for Brain Science, Harvard University Cambridge MA.

Mammalian brain circuits are complex assemblies of cells which develop through elaborate patterns of cell proliferation and migration. Studying the layout and developmental history of the individual neurons composing these circuits involves similar challenges and approaches. In particular, single cell labelling techniques can be used to trace neuronal anatomy or identify neural stem cell progeny. However, with a single type of label, comparing neighboring neurons or groups of clonally derived cells and analysing their interactions is difficult. Brainbow transgenes allow for distributing multiple labels in a cellular population, created by random combinations of 3-4 distinct fluorescent proteins (such as CFP, YFP and RFP). The resulting hues can be used as markers to track neuronal processes in space and cell lineage through cell divisions. I will present the steps that we are taking to develop approaches for multiplex circuit and lineage tracing based on this strategy, in particular: i) generating and expressing Brainbow transgenes with an expanded palette of labels in order to unambiguously individualize groups of clonally related cells; ii) developing volume imaging methods amenable to study neuronal projections of clones in their entirety. These approaches should be broadly applicable to a variety of questions and systems.



I-3. TRI CELLULAIRE DE NEURONES GÉNÉTIQUEMENT MARQUÉS POUR L'ANALYSE DU TRANSCRIPTOME ET DU CYCLE CELLULAIRE

S. Karaz⁽¹⁾, U. Borello⁽¹⁾, N. Boggetto^(1,2) et A. Pierani⁽¹⁾

(1) INSTITUT JACQUES-MONOD

CNRS UMR 7592, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité

(2) ImagoSeine

pierani.alessandra@ijm.univ-paris-diderot.fr

Le système nerveux des vertébrés est une structure dont la complexité s'illustre par la grande diversité de types neuronaux qu'il contient. Ces différents neurones forment, au cours du développement, des connexions stéréotypées et remplissent, chez l'adulte, des fonctions spécifiques. Au cours de l'évolution des mammifères, le néocortex est la structure du cerveau qui a subi une expansion majeure de sa taille relative et de sa complexité.

De manière à identifier et étudier des populations neuronales spécifiques au sein d'un système d'une telle complexité, nous utilisons une approche de traçage génétique chez la souris. Nous pouvons ainsi isoler des neurones d'intérêt par tri cellulaire sur la base de leur fluorescence. Ce type d'approche nous a permis d'avoir accès au transcriptome de populations particulières et, ainsi, de mieux appréhender leur fonction au cours du développement.

D'autre part, nous utilisons aussi une approche de cytométrie en flux afin d'étudier les changements des paramètres du cycle cellulaire en réponse à la surexpression de gènes d'intérêt. En particulier, nous présenterons l'utilisation d'un analyseur à haute vitesse permettant de visualiser les cellules triés.



I-4. TRI DE SYNAPSE PAR FLUORESCENCE: PURIFICATION DES SYNAPSES EXCITATRICES DU CERVEAU DE SOURIS

Etienne Herzog

UMRS 952 / 7224 Physiopathologie des maladies du Système Nerveux Central

The brain contains an intricate network of neurons, which communicate synapses and are connected to or surrounded by non-synaptic components of neurons and glia. Studies of synapse biology are confronted by this daunting complexity and make use of tissue fractionations in order to study isolated synaptic particles, called synaptosomes. Synaptosomes were instrumental in the discovery of synaptic functions and proteins. However, the interpretation of synaptosome-derived data is confounded, because synaptosomal preparations are non-selectively enriched in all types of synapses and contain contaminants derived from non-synaptic neuronal and glial particles. Here, we extended conventional synaptosome preparations using a cell sorter and in this way established Fluorescence Activated Synaptosome Sorting (FASS). Using VGLUT1VENUS knock-in mice as a source of fluorescent VGLUT1 synaptosomes we show that FASS isolates intact and highly pure VGLUT1 synaptosomes containing pre- and postsynaptic elements.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP7 : BIOLOGIE ANIMALE



I-1. SOUS-POPULATIONS DE CELLULES DENDRITIQUES : LE PORC, CHAINON MANQUANT ENTRE LA SOURIS ET L'HOMME ?

*F. Marquet¹, F. Pascale², C. Urien¹, G. Simon³, C. Kang², M. Bonneau², I. Schwartz-Cornil¹,
N. Bertho¹*

¹Virologie et Immunologie Moléculaires UR892; ²Centre de Recherche en Imagerie Interventionnelle, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France. ³ANSES Unité de Virologie Immunologie Porcines, Ploufragan (nicolas.bertho@jouy.inra.fr)

La peau de porc a des propriétés physiques et structurales proches de celles de la peau humaine, c'est pourquoi nous sommes intéressés au porc dans un contexte immunologique, afin d'établir si la peau porcine était un bon modèle immunologique de la peau humaine, pouvant être utilisée dans la mise au point d'essais de vaccinations cutanées.

Les cellules dendritiques (CDs) sont les sentinelles du système immunitaire. Immatures dans les tissus périphériques, elles possèdent de grandes capacités d'internalisation des antigènes. Lors d'une infection, elles vont maturer et migrer dans les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions drainants où elles activeront la réponse immunitaire primaire. A l'état basal des expériences indirectes chez la souris ont montré que des CDs tolérogènes migraient dans un état intermédiaire de maturation nommé 'semi-maturité'.

Depuis une dizaine d'années il a été décrit différentes sous-populations de CDs, centrales et périphériques. Chez la souris elles peuvent-être grossièrement réparties en quatre classes : les CDs cross-primantes activant préférentiellement la réponse cytotoxique (CDs CD8 α^+ dans la rate et les ganglions & CDs CD103⁺ dans les tissus périphériques), les CDs activant préférentiellement la réponse humorale (CDs CD11b^{high}), et les CDs inflammatoires, se différenciant à partir de monocytes lors d'épisodes inflammatoires, auxquelles nous pouvons ajouter les cellules de Langerhans de l'épiderme. Cette classification peut-être partiellement retrouvée pour les CDs sanguines humaines (CDs BDCA3⁺ ressemblant aux CD8 α^+ & CD103⁺ de la souris et CDs BDCA1⁺ ressemblant aux CD11b^{high} de la souris). Cependant leur équivalence avec les sous populations de CDs de tissus périphériques, notamment la peau, reste à établir.

Dans ce travail nous décrivons chez le porc, la mise au point d'une méthode de cathétérisme lymphatique pseudo afférent permettant la collecte de cellules lymphatiques migrant des territoires cutanés vers les ganglions drainants. Nous avons analysé l'état de maturation des CDs ainsi collectées et avons pu décrire les sous populations de CDs cutanées ainsi que leurs capacités de migration dans la lymphe. Grâce à ce travail nous sommes aujourd'hui en mesure de proposer une nouvelle classification des sous populations de CDs cutanées, réconciliant les données obtenues chez la souris, l'homme et le porc. Finalement, ce travail permet aussi de proposer le porc comme un modèle pertinent pour le développement de protocoles de vaccination cutanée.



I-2. MECHANISMS OF HOST RECOGNITION BY BARTONELLA SPECIES

Muriel Vayssier-Taussat

Bacterial pathogens typically infect only a limited range of hosts; however, the genetic mechanisms governing host-specificity are poorly understood. The α -proteobacterial genus *Bartonella* comprises 21 species that cause host-specific intraerythrocytic bacteremia as hallmark of infection in their respective mammalian reservoirs, including the human-specific pathogens *Bartonella quintana* and *Bartonella bacilliformis* that cause trench fever and Oroya fever, respectively. Here, we have identified bacterial factors that mediate host-specific erythrocyte colonization in the mammalian reservoirs. Using mouse-specific *Bartonella birtlesii*, human-specific *Bartonella quintana*, cat-specific *Bartonella henselae* and rat-specific *Bartonella tribocorum*, we established in vitro adhesion and invasion assays with isolated erythrocytes that fully reproduce the host-specificity of erythrocyte infection as observed in vivo. By signature-tagged mutagenesis of *B. birtlesii* and mutant selection in a mouse infection model we identified mutants impaired in establishing intraerythrocytic bacteremia. Among 45 abacteremic mutants, five failed to adhere to and invade mouse erythrocytes in vitro. The corresponding genes encode

components of the type IV secretion system (T4SS) Trw, demonstrating that this virulence factor laterally acquired by the *Bartonella* lineage is directly involved in adherence to erythrocytes. Strikingly, ectopic expression of Trw of rat-specific *B. tribocorum* in cat-specific *B. henselae* or human-specific *B. quintana* expanded their host range for erythrocyte infection to rat, demonstrating that Trw mediates host-specific erythrocyte infection. A molecular evolutionary analysis of the *trw* locus further indicated that the variable, surface-located TrwL and TrwJ might represent the T4SS components that determine host-specificity of erythrocyte parasitism. In conclusion, we show that the laterally acquired Trw T4SS diversified in the *Bartonella* lineage to facilitate host-restricted adhesion to erythrocytes in a wide range of mammals.



I-3. GLYCINE AND ITS N-METHYLATED ANALOGUES CAUSE PH-DEPENDENT MEMBRANE DAMAGE TO ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI*

D. Vanhauteghem^{1,2}, *G. P. J. Janssens*¹, *A. Lauwaerts*³, *S. Sys*⁴, *F. Boyen*⁵, *I. D. Kalmar*¹, *E. Meyer*²

¹Laboratory of Animal Nutrition, Department of Nutrition, Genetics and Ethology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium (donna.vanhauteghem@ugent.be);

²Laboratory of Biochemistry, Department of Pharmacology, Toxicology and Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium; ³Taminco N.V., Ghent, Belgium,

⁴Department of Internal Medicine and Clinical Biology of Large Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium; ⁵Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium

The current study investigates the emulsifying potential of glycine and its N-methylated derivatives *N*-methylglycine (sarcosine), *N,N*-dimethylglycine (DMG) and *N,N,N*-trimethylglycine (betaine) under varying pH conditions. Subsequently, the effect of these test compounds on the membrane integrity of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) was evaluated.

Oil in water emulsions show that DMG is a more potent enhancer of emulsification than glycine, sarcosine and betaine. Flow cytometry was used to investigate whether this emulsifying potential is associated with an effect on ETEC membrane integrity. Bacteria were exposed to each of the test compounds under varying pH conditions and membrane integrity was assessed using the LIVE/DEAD BacLight kit. This kit consists of two nucleic acid stains: green fluorescent SYTO 9 is cell-permeable and can freely enter all ETEC, either live or dead, and red fluorescent propidium iodide (PI) can only enter membrane-compromised cells. Membrane integrity analysis with SYTO 9/PI revealed a unique fluorescence pattern directly related to the degree of membrane damage. Three bacterial subpopulations could be identified: live, intermediate and dead. With increasing membrane permeability there was a shift in green and red fluorescence.

These data clearly show pH- and time-dependent ETEC membrane deterioration due to exposure to glycine, sarcosine and DMG, but not betaine, with an onset at pH 9.0. Conventional plate counts confirmed concomitant changes in culturability of the membrane compromised bacteria. The decrease in number of culturable bacteria when incubated with glycine, sarcosine or DMG at high alkalinity follows the same trend as the decrease in the percentage of live bacteria shown by flow cytometry. However, in the samples incubated for 20h at pH 10.0 with each of these three test compounds the portion of live bacteria is <1%, while there are still culturable ETEC counted after plating. This observation suggests that the subpopulation of intermediate bacteria is heterogeneous consisting of culturable and non-culturable ETEC, with varying degrees of membrane damage. This heterogeneity confirms the presence of various viability states within this intermediate population. In conclusion, the current results show a decrease in ETEC viability due to membrane damage caused by glycine, sarcosine and DMG under alkaline stress conditions, while only DMG could be identified as a weak enhancer of emulsification. In contrast, no emulsifying nor membrane altering properties could be established for betaine. Even though the pH-dependent membrane altering effect of glycine, sarcosine and DMG on ETEC is clearly demonstrated, the underlying mechanism remains to be elucidated.



I-4. FLOW CYTOMETRIC DETECTION OF MYELOPEROXIDASE IN HORSE NEUTROPHILS: A NOVEL TECHNIQUE IN EQUINE DIAGNOSTIC RESEARCH

Jella Wauters⁽¹⁾, Thierry Franck⁽²⁾, Frederik Pille⁽³⁾, Ann Martens⁽³⁾, Didier Serteyn⁽²⁾, Frank Gasthuys⁽³⁾, Evelyne Meyer⁽¹⁾

⁽¹⁾Department of Pharmacology, Toxicology and Biochemistry
Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylane 133, 9820 Merelbeke, Belgium

⁽²⁾Department of Large Animal Surgery and Center for Oxygen Research and Development, University of Liège, Bât. B42, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgium

⁽³⁾Department of Surgery and Anaesthesiology of Domestic Animals
Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylane 133, 9820 Merelbeke, Belgium

* Corresponding author. Tel.: +32 92 64 73 56; fax: +32 92 64 74 97

E-mail address: jella.wauters@ugent.be

Myeloperoxidase (MPO) is considered to be selectively expressed in germinative cells of granulocytes and monocytes but not lymphocytes. In human diagnostic medicine the cellular detection of MPO has become a valuable clinical tool for pathologies such as acute myeloid leukemia. Cellular MPO detection might also be relevant in equine pathological conditions.

Therefore, we developed a standardized flow cytometric protocol for the detection of equine surface and total cellular (= surface and intracellular) MPO, including the choice of fixation (Fix versus Formaldehyde) and permeabilization technique (Fix and Perm versus Formaldehyde and FACSPERM), of secondary antibody in the indirect labeling approach (Alexa Fluor 488 versus Allophycocyanin (APC) labeled secondary antibody) and of fluorochrome for the primary antibody in the direct labeling approach (DyLight 649 versus Atto633). Titrations of these antibodies were performed on equine white blood cells and controls for reproducibility were included.

For surface staining, membrane fixation with Formaldehyde was used, while the Fix and Perm protocol was chosen for membrane permeabilization. Indirect staining was performed with the Alexa Fluor 488 labeled antibody because of its low variability and excellent discrimination potential of the three leukocyte populations. For the direct staining of the primary MPO antibody, the DyLight 649 fluorochrome was the preferred choice being characterized by a strong fluorescent signal with low spread and also the ability to discriminate between equine neutrophil, monocyte and lymphocyte populations. The good repeatability of the primary antibody titration illustrated the reproducibility of the flow cytometric technique.

The defined flow cytometric protocols for indirect and direct intracellular MPO detection are applied in ongoing research to validate the possible diagnostic properties of MPO in equine infectious versus non-infectious joint disease.

Research funded by a Ph.D. grant of the Institute for the Promotion of Innovation through Science and Technology in Flanders (IWT-Vlaanderen)



I-5. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE CELLULES SOUCHES SOMATIQUES DERIVEES DU MUSCLE CHEZ LE CHIEN

B. Lieubeau⁽¹⁾, T. Larcher⁽²⁾, L. Dubreil⁽²⁾, JY. Deschamps⁽²⁾, G. Jouvion⁽³⁾, M. Ledevin⁽²⁾, C. Zuber⁽²⁾, I. Leroux⁽²⁾, L. Guiguand⁽²⁾, Y. Chérel⁽²⁾, K. Rouger⁽²⁾.

⁽¹⁾Immuno-Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire, UMR707 INRA/ONIRIS/Université de Nantes, ONIRIS, Nantes ; ⁽²⁾Développement et Pathologie du Tissu Musculaire, UMR703 INRA/ONIRIS, ONIRIS, Nantes ; ⁽³⁾Histopathologie Humaine et Modèles Animaux, Département Infection et Epidémiologie, Institut Pasteur, Paris ; (blandine.lieubeau@oniris-nantes.fr).

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une pathologie musculaire récessive liée au chromosome X qui résulte de mutations du gène de la dystrophine. Elle se caractérise par une absence complète de la protéine qui se traduit par une nécrose des fibres musculaires, associée cliniquement à une faiblesse musculaire progressive. En absence de traitement efficace, l'utilisation des cellules souches adultes pourrait constituer une alternative thérapeutique intéressante comme le suggèrent les études réalisées chez la souris.

Le travail présenté s'inscrit dans une étude menée chez le chien par l'UMR 703 INRA/ONIRIS « Développement et Pathologie du Tissu Musculaire » dont le but était (1) d'identifier et caractériser une population de cellules souches musculaires, isolées à partir de muscle de chien sain et (2) d'étudier leur potentiel thérapeutique chez le chien dystrophinopathe GRMD pour « *Golden Retriever Muscular Dystrophy* », modèle cliniquement pertinent de la DMD.

Les cellules souches isolées, appelées cellules MuStem, ont été phénotypées par cytométrie de flux. Si la cytométrie de flux s'est imposée comme un outil puissant et incontournable pour la caractérisation de cellules, la palette d'outils destinés à la recherche sur les modèles gros animaux reste limitée et l'analyse de résultats obtenus avec des réactifs non spécifiques d'espèce requiert une certaine prudence.

L'amélioration importante et persistante de l'état clinique des chiens GRMD après injection systémique de cellules MuStem, associée à une correction du phénotype tissulaire, présente ces cellules comme des candidates potentielles à la thérapie cellulaire de la DMD.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP8 : CYCLE CELLULAIRE



RESUME DES COMMUNICATIONS

SP8 - CYCLE CELLULAIRE

I – Orateurs prévus

I-1 RÔLE DE LA CYCLINE G DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* DANS LE CYCLE CELLULAIRE

Floria Faradji, Sébastien Boyer, Delphine Cumenal, Neel B. Randsholt and Frédérique Peronnet.

Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR CNRS 7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Chromatine et Développement, Paris, F-75005 France
(frederique.peronnet@upmc.fr)

Les cyclines G sont des cyclines atypiques dont le rôle est complexe. Chez les mammifères, Cycline G1 est un régulateur négatif du cycle cellulaire qui induit un arrêt à la transition G2/M ainsi que de l'apoptose en réponse à des dommages de l'ADN. Dans certains contextes cellulaires, elle joue cependant un rôle positif dans la prolifération cellulaire. Cycline G2 est un régulateur négatif du cycle cellulaire, impliquée dans l'arrêt du cycle en G1/S. Chez la drosophile, *CycG* est le seul gène codant pour la Cycline G. Les dérégulations de *CycG* induisent une forte létalité et une instabilité du développement.

Ici, nous voulions, mieux comprendre le rôle de Cycline G de *D. melanogaster* dans la prolifération et le cycle cellulaires. Ainsi, nous avons montré que la surexpression ubiquitaire de *CycG* produit des individus de petite taille. La surexpression de *CycG* réduit la taille des cellules alors que son inactivation par ARN interférence tend à promouvoir augmenter la taille des cellules. De plus, la surexpression de *CycG* induit un allongement du cycle cellulaire et une diminution du nombre de cellules. L'étude du cycle cellulaire après incorporation d'EdU a permis de montrer que Cycline G est impliquée dans la transition G1/S et dans la progression de la phase S.

Ainsi, Cycline G est impliquée dans le contrôle négatif de la croissance et du cycle cellulaire. Ces deux fonctions semblent en faire un acteur important pour la stabilité du développement.

Mots clés : Cycline G, drosophile, croissance, cycle cellulaire, stabilité du développement



I-2 CELL CYCLE, APOPTOSIS AND DNA REPAIR OF CELLS IN SPACE CONDITIONS

^{1,2}M. Beck

¹Molecular and Cellular Biology, Radiobiology Unit, SCK•CEN, Mol, Belgium;

²Molecular Biotechnology, Ghent University, Belgium.

In space, the human body undergoes many different stresses leading to health alterations at various levels (bone and muscle integrity, immune and vascular system deficiency, vestibular and circadian rhythm disturbances, etc.). A major question is how space conditions alter human health during long-term space missions. Two major factors related to space are supposed to have relevant effects on living organisms: cosmic radiations and weightlessness. Although the dose rate on the International Space Station is rather low ($\sim 162 \text{ mGy d}^{-1}$), cosmic rays are highly energetic and heterogeneous in nature. In outer space, increased levels of radiation are found, which in addition to solar events constitute a higher risk for long term missions. Extensive research in radiobiology allowed the understanding of part of the effects of high doses ($> 100\text{mGy}$) of low linear energy transfer (LET) radiation (e.g. X-rays). However, it is believed that low doses of radiation are deleterious as well, especially for the risk of radiation-induced cancer. Moreover, little is known about high LET radiation effects found in space. As far as microgravity is concerned, evidence shows that it causes most of the symptoms observed on astronauts. At the cellular level, it affects cytoskeleton and many signaling pathways linked to cell movement, communication and proliferation. The possibility that combined radiation and microgravity increases long duration space mission risks has to be taken into account.

DNA double strand breaks (DSBs) are assumed to constitute the major radiation-induced cytotoxic lesions. Upon DSB formation, signaling pathways involve DNA repair machinery and G1/S or G2/M cell cycle arrest. Cell cycle arrest allows proper DNA repair. Improperly repaired DSBs lead to DNA sequence integrity alterations or to cell death by apoptosis. Therefore, radiation-induced DNA damage leads to three different cell fates: proper or improper repair that both allow reentrance in proliferation, or cell death. Improperly repaired cells that survive may present alterations in their DNA sequence, leading to possible genomic instability. Genomic instability constitutes a risk of developing cancer.

This presentation is an overview of the cytotoxic effects of radiation and their implications for cell cycle and proliferation. The role that microgravity could play in these mechanisms will be also addressed.

This research is financially supported by PRODEX/ESA/BELSPO contracts (C90-303, C90-380 and C90-391).



I-3. MISE EN PLACE DU SYSTEME DE RESTRICTION D'EXPRESSION DE LA CYTIDINE DEAMINASE AID EN PHASES G1 OU S/G2/M DU CYCLE CELLULAIRE

M. Zivojnovic(1), J-C. Weill(1,2), C-A. Reynaud(1,2), S. Storck(1,2)

(1) Université Paris Descartes, (2) INSERM U783

Pour augmenter l'affinité des anticorps sécrétés en réponse à un antigène, les gènes d'immunoglobulines subissent un processus de mutagenèse adaptative nommé hypermutation somatique. Le mécanisme moléculaire responsable de l'introduction des mutations est initié par l'action de l'enzyme *activation-induced deaminase* (AID) qui désamine les cytosines au sein de l'ADN. Dans un deuxième temps, l'uracile provenant de la désamination est réparé de façon erronée, ce qui permet la diversification des mutations au site de désamination et leur propagation aux bases environnantes. Si l'uracile est pris en charge par la voie de réparation de l'uracile *N-glycosylase* (UNG), il reste à sa place un site abasique qui est non-instructif pour les ADN polymérases répliquatives, mais franchissable par les ADN polymérases translésionnelles dont le taux d'erreur est très élevé. Si le mésappariement U:G est reconnu par la voie du « mismatch repair », le brin d'ADN entourant l'uracile est dégradé puis néo-synthétisé par une autre ADN polymérase translésionnelle mutagène, l'ADN polymérase η (Pol η). Cette seconde voie est responsable de la totalité des mutations des bases A et T.

Comment s'effectue le choix entre ces deux voies de réparation mutagènes? L'équipe d'accueil a proposé que l'implication de ces deux voies puisse être régulée en fonction du cycle cellulaire: les mutations des paires A:T seraient introduites par la voie du mismatch repair en phase G1 alors que la voie UNG introduirait les autres mutations lors de la phase S. Une façon de tester ce modèle mécanique consiste à restreindre l'activité d'une de protéines effectrices de l'hypermutation somatique à une phase du cycle cellulaire précise. Ainsi, la restriction d'AID, d'ailleurs exprimée uniformément au cours du cycle cellulaire, à la phase G1 devrait affecter préférentiellement les mutations des sites G:C.

La restriction d'expression d'AID en une seule phase du cycle cellulaire a été réalisée en utilisant le système Fucci. Celui-ci a été développé par Sakue-Sawano pour permettre la détermination de la phase du cycle cellulaire de chaque cellule au sein d'une population de cellules en culture ou au sein d'un tissu donné (Sakaue-Sawano et al., 2008). Il est fondé sur la fusion d'une protéine fluorescente et du « dégron », un peptide qui induit la dégradation cyclique de toute protéine dans la fusion en fonction de la progression du cycle cellulaire. Dans notre approche où AID est à dégrader en dehors de la phase G1, on la fusionne avec un dégron issu de la protéine hCDT1. S'il faut confiner l'expression d'AID aux phases S/G2/M, la dégradation en dehors de ces phases est assurée par la fusion avec une partie de la protéine Geminin.

Nous démontrons le fonctionnement de ce système de restriction d'AID, ainsi que la fonctionnalité de la protéine en fusion, au sein de différentes lignées cellulaires. Les travaux pour établir le fonctionnement de ce système dans le modèle murin est en cours.



I – 4 ANALYSE DE LA DIVISION CELLULAIRE CHEZ LA LEVURE *S. CEREVISIAE* PAR IMAGERIE EN FLUX AVEC L'IMAGE STREAM X

A. Floch⁽¹⁾, *N. Boggetto*⁽²⁾, *A. Chadrin*⁽¹⁾, *V. Doye*⁽¹⁾

⁽¹⁾ Equipe Pores nucléaires : transport et cycle cellulaire, Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS-Université Paris Diderot, Paris; ⁽²⁾ ImagoSeine : Cytométrie en Flux, Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS-Université Paris Diderot, Paris.

Chez les eucaryotes, les pores nucléaires (NPCs), complexes macromoléculaires ancrés dans l'enveloppe nucléaire, permettent l'échange des macromolécules entre le noyau et le cytoplasme. Ils sont composés d'environ 30 protéines différentes appelées nucléoporines présentes en multiples copies. Quatre d'entre elles, dont la protéine Pom33 (Pore membrane protein 33kDa), ont des domaines transmembranaires et sont supposées ancrer les NPCs à l'EN. *POM33* est dupliqué chez la levure, et son paralogue, *PER33* (Pore and ER protein 33kDa) code pour une protéine qui se localise partiellement aux NPCs, mais principalement au réticulum endoplasmique. Pom33 et Per33 appartiennent à une famille de protéines membranaires conservées au cours de l'évolution.

Les travaux de l'équipe ont mis en évidence que Pom33 contribue à l'assemblage *de novo* des NPCs chez la levure. Le mutant de délétion *pom33Δ* est viable et n'affecte pas le transport nucléocytoplasmique, mais provoque l'apparition d'un phénotype d'agrégation des NPCs (1). De plus, des analyses biochimiques ont révélé une interaction entre Pom33 et une protéine de la famille des réticulons, Rtn1. Cette protéine, avec laquelle Pom33 partage une topologie prédite, est impliquée dans la formation du réticulum tubulaire et l'assemblage *de novo* des NPCs.

Par ailleurs, *POM33* a été identifié dans un crible à haut débit par FACS, comme l'un des gènes dont la surexpression induit un défaut de cycle cellulaire (2). Nous avons également observé une légère résistance des mutants *pom33Δ* à des drogues affectant le cytosquelette (benomyl et latrunculine). Ces résultats indiquent que Pom33, au-delà de son rôle dans l'assemblage des NPCs, pourrait être impliquée dans des fonctions relatives à la régulation du cycle cellulaire et la dynamique du cytosquelette.

Afin de caractériser plus précisément la fonction de Pom33 dans le cycle cellulaire, nous avons utilisé la technique de M.I.F.C. (Multispectral Imaging Flow Cytometry) sur l'imager en flux ImageStream X (Amnis®). Cette technique combine l'analyse quantitative du cycle par cytométrie en flux et l'analyse précise par microscopie. Nous avons employé un protocole d'analyse sur des cellules haploïdes ou diploïdes avec un marquage de l'ADN au sytox green (3). Il nous a permis de mieux distinguer les cellules en G1, en S/G2 et en mitose en combinant les critères de forme du noyau et de son contenu en ADN. Avec ce protocole, nous avons analysé le cycle cellulaire de levures surexprimant Pom33 sous le contrôle d'un promoteur inductible. Nous avons observé que ces cellules présentent un défaut de croissance spécifique environ 4 heures après induction de Pom33-6HIS, ce qui n'est pas le cas lors de la surexpression de Rtn1. L'analyse par M.I.F.C. a permis d'observer que ce défaut est corrélé avec une augmentation de la population de levures en phase M.

Nous cherchons actuellement à utiliser l'analyse par M.I.F.C. pour caractériser plus finement l'impact de la surexpression de Pom33 ou de sa délétion sur la dynamique du cytosquelette au cours du cycle cellulaire.

.../...



.../...

Mots clés : pores nucléaires, levure, mitose, Image Stream X, cytométrie en flux

Références :

1. Chadrin A., Hess B., San Roman M., Gatti X., Lombard B., Loew D., Barral Y., Palancade B. & Doye V. (2010) *J. Cell Biol.*, 189(5):795-811
2. Stevenson LF, Kennedy BK, Harlow E. (2001) *PNAS*, 98:3946-51.
3. Calvert M, Lannigan J, (2010) *Curr. Protoc. Cytom.*, Chapter 9:Unit 9.32.1-16.



I-5 LES BONNES PRATIQUES POUR MESURER LE CONTENU EN ADN PAR CYTOMETRIE EN FLUX

X. Ronot (1), J. Sobczak-Thepot (2).

(1) Laboratoire CaCyS, FRE 3405 UJF-CNRS-EPHE, La Tronche (xavier.ronot@ujf-grenoble.fr) ; (2) Cycle cellulaire et différenciation, UMR 7622, CNRS-UPMC, Paris (Joelle.Sobczak_Thepot@upmc.fr).

L'analyse du cycle cellulaire demeure une des applications majeures de la cytométrie en flux. Elle repose sur le marquage stœchiométrique de l'ADN par un fluorochrome spécifique. L'analyse de la fluorescence par cytométrie en flux permet d'obtenir une distribution des cellules en fonction de leur contenu en ADN, reflet de leur position dans le cycle. Le résultat se présente sous la forme d'un histogramme monoparamétrique dont la résolution dépend de la qualité de la préparation de l'échantillon (isolement des cellules, fixation, marquage de l'ADN) et des performances du cytomètre.

Afin de déterminer le meilleur compromis, différents fixateurs, fluorochromes et kits commerciaux ont été comparés sur des cellules HeLa dans le cadre de l'atelier « Sensibilisation à l'analyse du cycle cellulaire » :

- Ethanol 70° (témoin), méthanol, acétone, formaldéhyde ;
- Iodure de propidium, DAPI, 7-aminoactinomycineD, TO-PRO-3, SYTOX®, Vybrant® DyeCycle™.

Plusieurs logiciels reposant sur des principes de déconvolution mathématique de l'histogramme expérimental (FlowJo, MultiCycle, Modfit, Venturi) ont été également testés afin d'extraire les effectifs dans les phases G0/1, S et G2+M de populations témoins et traitées par des modulateurs du cycle cellulaire. L'estimation des fractions de cellules dans les différentes phases dépend du coefficient de variation des pics G0/1 et G2+M, de l'effectif des cellules et du modèle de déconvolution mathématique employé. D'autre part, la possibilité d'éliminer les doublets et agrégats cellulaires ne doit pas faire oublier que la qualité de préparation des suspensions cellulaires doit être privilégiée.

Une des limites de l'analyse monoparamétrique du cycle cellulaire se trouve dans l'impossibilité de différencier les cellules en début et en fin de phase S, des cellules en G0/1 et G2+M respectivement. Afin d'obtenir davantage d'informations sur le cycle cellulaire, il est possible de combiner cette mesure du contenu en ADN à d'autres paramètres, tels que la réplication (en utilisant la BromodésoxyUridine ou l'EdU), ou la présence de protéines particulières, directement associées ou non au phénomène prolifératif (antigène Ki67, histone H3 phosphorylée, épitope MPM2 (*Mitotic phosphoprotein 2*), PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), cyclines,...).

Enfin, la détection des troubles de la cytodivision, conduisant à l'obtention de cellules binucléées, constitue un exemple particulier où la cytométrie en flux montre ses faiblesses.

Référence : Cytométrie en flux et cycle cellulaire. D. Grunwald, J.F Mayol & X. Ronot (eds) Tec & Lavoisier, Paris, 2010.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP9-1 : FORUM DES TECHNICIENS



RESUME DES COMMUNICATIONS

SP9-1 - FORUM DES TECHNICIENS

I – Orateurs prévus

I-1. FLOW CYTOMETRY : OUT OF CONTROL?

Nathalie Jouy

Service commun de cytométrie en flux et de tri cellulaire de l'Institut de Médecines prédictives et de Recherches Thérapeutiques (IFR114 - BICeL, Lille).

Qu'est-ce qu'un contrôle ? C'est une surveillance attentive mais c'est aussi garder la maîtrise et les commandes de ce qu'on utilise. Des contrôles, il y en a à tous les niveaux : Instrumentation, Réactif, expériences. La cytométrie en flux exige des contrôles techniques rigoureux pour permettre une interprétation correcte des histogrammes obtenus. Elle commence par une préparation adéquate des échantillons, une étape aussi importante qu'une bonne élaboration du protocole expérimental. En effet, chaque application de cytométrie possède ses propres contraintes tant pour du phénotypage que pour des expériences plus fonctionnelles. Le contrôle sert de référence pour déterminer un seuil de positivité ou négativité et ainsi pouvoir positionner votre expérience.

Je vous propose d'en voir des exemples à travers diverses applications comme un phénotypage multi couleurs, la numération sanguine murine, et des dosages fonctionnels.



I-2. TRI DE CELLULES ENDOTHELIALES ET HEMATOPOÏÉTIQUES D'EMBRYONS DE POULET

P.-Y.Canto⁽¹⁾, A.Lempereur⁽¹⁾, C.Drevon⁽¹⁾, A.M.Faussat⁽²⁾, S.Bornens⁽³⁾, T.Jaffredo⁽¹⁾

⁽¹⁾ Migration et différenciation des cellules souches hématopoïétiques, CNRS, UPMC, UMR7622 Biologie du Développement, Paris

⁽²⁾ Plate-Forme de Cytométrie en flux IFR65, Paris

⁽³⁾ Plate-Forme de PCR en temps réel de l'IFR83, Paris

Chez les vertébrés, l'aorte embryonnaire est le seul site connu capable de générer des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) de façon autonome. Cette hématopoïèse est produite à partir des cellules endothéliales (CE) de la paroi ventrale du vaisseau, qui perdent leur identité (endothéliale) et acquièrent une identité hématopoïétique. Ces CE particulières sont qualifiées d'hémogéniques.

Nous travaillons sur le rôle de la voie BMP/TGF β dans la production des CSH aortiques chez l'embryon de poulet et de souris dans le but de décrypter les voies de signalisation à l'œuvre dans ce processus et d'identifier les mécanismes conservés entre les espèces. Je présenterai ici les résultats associés au travail sur l'Oiseau.

Afin d'analyser la combinatoire des récepteurs et effecteurs de la voie BMP/TGF β dans l'hématopoïèse aortique de l'embryon de poulet, nous procédons à des PCR quantitatives (qPCR) sur ARN de CE et de cellules hématopoïétiques (CH) triées par cytométrie en flux.

Chez le poulet, nous ne disposons pas d'anticorps spécifique pour les CE tel que CD31 ou Flk1 chez la souris et l'homme. Nous utilisons donc des lipoprotéines de faible densité AcLDL (Acetylated Low Density Lipoproteins) qui ont la particularité d'être spécifiquement endocytosées par les CE et les macrophages. Les AcLDL sont couplées au fluorochrome Alexa 488 ce qui permet de récupérer les cellules marquées en tri.

Ces AcLDLs sont introduits dans la circulation de l'embryon par inoculation intracardiaque. CE et CH sont ensuite récupérées après dissection et dissociation enzymatique à des stades pré-hématopoïétiques (2,5 jours) ou hématopoïétiques (3,5 jours). Pour les CH/CSH, nous utilisons un anticorps anti-CD45. A E2,5 jours de développement seules les CE sont présentes dans l'embryon. Elles présentent un profil AcLDL⁺/CD45⁻. A 3,5 jours embryonnaires les CE sont AcLDL⁺/CD45⁻ et les CH/CSH AcLDL⁺/CD45⁺. Nous pouvons aisément discriminer les populations de macrophages qui sont AcLDL⁺/CD45^{high} des progéniteurs hématopoïétiques qui sont AcLDL^{int}/CD45^{int}.

Les qPCR sont réalisées sur les deux fractions d'intérêt : AcLDL⁺/CD45⁻ (CE) et AcLDL^{int}/CD45^{int} (CH/CSH).

Les résultats de ces expériences ont permis de mettre en évidence une surexpression des récepteurs alk1, tgfb β 2 et de l'endogline dans les CE à E2,5 ainsi que du facteur de transcription smad2. Au cours de l'émergence hématopoïétique à E3,5, l'expression de ces gènes diminue dans les CH à l'exception de smad2 qui est maintenu.

Ces résultats montrent une activation de la voie tgfb β /alk1 modulée par l'endogline dans les CE à E2,5. Nous poursuivons cette analyse afin de mettre en évidence les différences d'expression de la voie BMP/TGF β entre CE et CH à E3,5 au moment de l'hématopoïèse aortique.



II -1. DÉPISTAGE DES PATHOLOGIES LYMPHOCYTAIRES PAR IMMUNOPHENOTYPAGE SUR ACCURI C6

Claire Loosen, Yvan Cornet, Nicolas Neyman, Alex Dromelet, Nicolas Bailly, Nicole Meunier, François Mullier, Bernard Chatelain

CHU Mont-Godinne, Laboratoire d'Hématologie, 5530 Yvoir, Belgique
(yvan.cornet@uclouvain.be)

But :

Tester dans les pathologies lymphoïdes l'efficacité d'un immunophénotypage sanguin à l'aide d'un cocktail d'anticorps sur Accuri C6.

Matériel et méthode :

67 patients sélectionnés présentent soit des lymphocytoses supérieures à 3000/ μ l, soit des éléments lymphoïdes suspects à l'observation microscopique. Les pathologies se répartissent en leucémie lymphoïde chronique (LLC) (n=24), lymphome de la zone marginale (LZM) (n=13), lymphome splénique de la zone marginale (LSZM) (n=1), lymphome à cellules du manteau (LCM) (n=1), lymphome T (LT) (n=2), lymphome lymphoblastique de type Burkitt (LL) (n=1), syndrome mononucléosique (n=5), lymphocytose B polyclonale de la femme fumeuse (n=1), hyperlymphocytose polyclonale (n=7). Des sujets normaux (n=12) ont également été inclus.

L'immunomarquage du sang total a été réalisé à l'aide d'un cocktail d'anticorps se composant de CD4FITC, CD10FITC, CD8PE, CD19PE, CD45PerCPCy5.5, CD5APC.

Après lyse au NH₄Cl et sans lavage, les échantillons sont étudiés sur le cytomètre Accuri C6 (BD Biosciences). La stratégie d'analyse est basée sur l'expression des marqueurs et particulièrement le CD45, CD5, CD10 et le rapport CD4/CD8. Une comparaison pour évaluer l'exactitude des taux de CD4, CD8 et CD19 sur l'Accuri a été réalisée à l'aide d'un cocktail 8 couleurs sur FacsCanto II contenant les anticorps suivants CD8/KappaFITC, CD56/LambdaPE, CD5PerCPCy5.5, CD19PECy7, CD10APC, CD3APCH7, CD4/CD20V450, CD45V500. Les valeurs absolues sont disponibles par une mesure directe en simple plateforme sans utilisation de standard de billes.

Résultats et discussion :

La comparaison des taux de CD4, CD8 et CD19 entre les deux cytomètres montre une bonne concordance pour les taux de CD4 (Moyenne Accuri (MA)=22.8 %/Moyenne CantoII (MC)=25.6 % – T-test non significatif (ns)), CD8 (MA=18.8 %/MC=20.4 % – ns). Une différence statistiquement significative mais sans répercussion clinique est observée pour les CD19 (MA=47.4 %/MC=45.8 %). . Toutes les hyperlymphocytoses B ont été détectées. Concernant les LLC, pour 5 d'entre elles subsiste une hésitation possible avec un LCM (expression du CD45 normale).

Deux LZM ont été détectés par la diminution de l'expression du CD45. Sur les 11 autres LZM, 5 d'entre eux sont retrouvés par l'augmentation du taux de CD19.

.../...



.../...

Le CD10 a contribué à la détection d'un LL de type Burkitt.

Les syndromes mononucléosiques ont tous été détectés par l'inversion du rapport CD4/CD8 en l'absence d'hyperlymphocytose B. Les hyperlymphocytoses polyclonales bénignes n'ont pas montré d'anomalies des répertoires T et B. La lymphocytose B polyclonale de la femme fumeuse n'avait ni diminution de l'expression du CD45, ni expression du CD5 par lymphocytes B.

Les deux lymphomes T ont été détectés par une anomalie dans l'expression des CD5, CD4 ou CD8 (perte d'expression ou diminution d'expression).

Conclusion :

L'immunophénotypage réalisé à l'aide du cocktail proposé sur l'Accuri C6 se révèle une méthode efficace et rapide pour détecter les pathologies lymphocytaires. L'obtention des valeurs absolues constitue un moyen appréciable pour la distinction des patients LLC CD5+ (>5000 lymphocytes CD5+).

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP10-1 : IMMUNOLOGIE 1



I-1. IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF MESENCHYMAL STEM CELLS

M. Giuliani (1), N. Oudhriri (2), S. Chouaib (3), J.J. Lataillade (1) and A. Bennaceur-Griscelli (2).

(1) UMR 972 INSERM, CTSA Hôpital Percy – Clamart

(2) UMR 935 INSERM, Human embryonic stem cell Core Facility, Hôpital Paul Brousse – Villejuif

(3) UMR 753 INSERM, Institut Gustave Roussy (IGR) – Villejuif

(giulianimas@hotmail.com)

A major issue in immunosuppressive biotherapy is the use of mesenchymal stem cells (MSC) that harbour regulatory capacity. These MSC are characterized by high proliferation and differentiation ability in mesenchymal lineage, such as chondrocytes, osteoblasts and adipocytes (1). However, the reason for their use in allograft rejection and treatment of Graft versus Host Disease (GvHD) are their immunomodulation properties (2). In fact, MSC impair immune response in Dendritic cells (DC), as well as in B and T cells (reviewed in 3).

The effects of MSC on Natural Killer (NK) cells, key players in defence against pathogens and malignant cells, as well as a regulatory role in allograft rejection and GvHD (4), has been widely investigated (5, 6), although the complex mechanism of inhibition is not clear.

Herein, we report that bone marrow-derived MSC inhibit the NK cell lytic machinery and the ability of NK cells to interact with target cells, leading to the impairment to their cytotoxic functions. By impairing NK functions, MSC protect against GvHD and may delay graft rejection, strengthen their use in cell therapy.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Allograft rejection, NK cells, cell therapy

References

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284(5411):143-147.
2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8(4):315-317.
3. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):726-36.
4. Caligiuri MA: Human natural killer cells. *Blood* 2008, 112(3):461-469.
5. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L: Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006, 107(4):1484-1490.
6. Giuliani M, Oudhriri N, Noman ZM, Vernochet A, Chouaib S, Azzarone B, Durrbach A, Bennaceur-Griscelli A. Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells downregulate NK cell cytolytic machinery (BLOOD, in press).



I-2. RAPID GENERATION OF FULL CLINICAL GRADE HUMAN ANTI-VIRUS CYTOTOXIC T CELLS FOR ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY

Aïssi-Rothé L^{1,2,3}, Wang Y^{1,2,3}, Decot V^{1,2,3}, Venard V⁴, Jeulin H⁴, Salmon A⁵, Clement L⁵, Dalle Jh⁶, Stoltz Jf^{1,2,3}, Bordigoni P⁵, Bensoussan D^{1,2,3}.

- 1- CHU de Nancy, Unité de Thérapie cellulaire et Tissus, Vandœuvre-Lès-Nancy, F54511-France
- 2- Nancy Université-UHP, Nancy, F-54000 -France
- 3- CNRS UMR 7561, Nancy, F-54000 -France
- 4- CHU de Nancy, Laboratoire de Virologie, Vandœuvre-Lès-Nancy, F54511-France
- 5- CHU de Nancy, Unité de Transplantation Médullaire, Hôpital d'Enfants, Vandœuvre-Lès-Nancy, F54511-France
- 6- Hôpital Robert Debré, APHP, Service d'Hémo-Immunologie, Paris, F 75935-France

Summary

Viral infections represent one of the main causes of morbidity and mortality following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Cytomegalovirus (CMV), Epstein Barr virus (EBV) and Adenovirus (ADV) infections often occur during the first three months after HSCT or in case of GVHD. Combining viral molecular load assessment with viral-specific immune monitoring has been shown to be very helpful to determine whether a patient needs pre-emptive anti-viral therapy. However, despite new anti-viral strategies, it has been demonstrated that a sufficient host T cell response is essential to clear the virus. Absence of specific immune reconstitution may explain anti-viral treatment failure. Adoptive transfer of donor-derived virus-specific T cells may be a good option that has already proved feasible and safe and helpful in specific anti-viral immune reconstitution. Preliminary feasibility data showed that, after adoptive T cell transfer, an *in vivo* expansion was observed, associated with a reduction or even a clearance of viral load and clinical improvement of human viral disease. The main drawback of this technology is the limited availability of well-defined antigens for T cell stimulation. In order to achieve a fast production of virus-specific T cells lacking alloreactivity, we developed a model of rapid complete clinical grade generation of Human anti-ADV cytotoxic T cells.

Seven healthy donor mononuclear cells (PBMC) known for their good cellular immunity against ADV, were stimulated during 6 hours with the Peptivator-ADV5 (Miltenyi Biotec), a synthetic overlapping peptide pool covering the ADV5 Hexon protein. Gamma Interferon (IFN- γ) given healthy donor mononuclear cells (PBMC) known for their good cellular immunity against ADV, were stimulated during 6 hours with a mean number of $1.01 \pm 0.84 \times 10^6$ total nucleated cells (TNC) was obtained. The isolated ADV-specific T cells were mainly CD4 positive (mean = 56 % \pm 5.59 %, yield = 51 % \pm 32.43%) but also CD8 positive (mean = 42 % \pm 27 %, yield = 56 % \pm 39.3 %). Isolated T lymphocytes (CTL) amplification was performed *in vitro* to perform the functional quality controls. The ability of the amplified CTL to secrete IFN- γ to perform the functional quality controls. The ability of the amplified CTL to secrete IFN- γ positive (mean = 56 % \pm 5.59 %, yield = 51 % \pm 32.43%) but also CD8 positive (mean = 42 % \pm 27 %, yield = 56 % \pm 39.3 %). Isolated T lymphocytes (CTL) amplified against non loaded target cells. Finally, we could observe a decrease of 1.27 Log of the allogeneic reaction against non HLA identical healthy donor PBMC with CTL compared to the PBMC before selection.

.../...



.../...

Good Manufacturing Practice-grade generation of ADV-specific T cells for adoptive immunotherapy could be achieved with a synthetic antigen. This technology presents the advantages to be fast, without any *in vitro* amplification before infusion, and to allow a good reactivity to propose immunotherapy in case of anti-viral treatment failure.

Two patients, with an anti-viral resistant ADV infection, were infused with donor ADV-specific T cell, prepared in our centre after French regulatory agency non opposition. Immune reconstitution and viral load were monitored after infusion and outcome of the patients will be presented. A multicentric clinical trial is now open where our centre is dedicated to cell production.

The concern is now to develop the same immunotherapy against CMV and EBV. If CMV results with Peptivator pp65 are very encouraging, EBV stimulation step needs to be improved. Preliminary results will be reported.



II.1 APPORTS DE LA CYTOMETRIE MULTIPARAMETRIQUE POUR L'EXPLORATION FONCTIONNELLE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE INNEE DANS UN SYSTEME CELLULAIRE COMPLEXE

Françoise Gondois-Rey 1,2,3, Samuel Granjeaud 4, Le Thi Kieu Suong 1,2,3, Diana Herrera 1,2,3, Ivan Hirsch 1,2,3 and Daniel Olive 1,2,3

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille,

2 Plateforme d'Immuno-monitoring IBiSA, F-13009 Marseille,

3 Université de la Méditerranée, F-13007, Marseille, France,

4 IFR 137, F-13009 Marseille.

Les développements de la cytométrie multi-paramétrique ont contribué à des avancées significatives en immunologie humaine. Si l'exploration multi-fonctionnelle de populations rares en est un exemple bien documenté, son utilisation pour étudier la dynamique de systèmes cellulaires complexes a été peu décrite. Notre objectif a été d'évaluer les apports de la cytométrie multi-paramétrique dans ce domaine. Nous avons utilisé comme système dynamique complexe la réponse immunitaire innée développée après une infection virale. Elle est soutenue par de nombreuses interactions cellulaires impliquant à la fois les cellules infectées et des cellules dotées de fonctions spécifiques de reconnaissance des virus ou effectrices précoces.

Les PBMC stimulés avec le virus de la grippe ont constitué notre modèle expérimental. Ils contiennent des cellules dendritiques, pDC et mDC, des NK et des monocytes, qui en plus d'être des effecteurs de l'immunité innée sont infectables par la grippe. Nous avons développé des panels de 12 couleurs pour analyser dans les populations simultanément et en cinétique l'expression de marqueurs fonctionnels, cytokines intra-cellulaires (IFN- α , IL-12, IL-6, TNF- α , IFN- γ), et CD107 comme marqueur de la fonction cytotoxique, ainsi que leur infection. Les panels ont permis d'explorer fiablement à la fois l'activation directe des DC et indirecte des NK au sein de l'environnement cellulaire complexe. Les multiples mesures cinétiques rendues possibles grâce à la cytométrie, ont été analysées à l'aide d'outils bio-informatiques. L'analyse globale des résultats sous la forme de clusters a permis de mettre en évidence des informations nouvelles sur la dynamique, la coordination des différentes voies d'activation induites, et leur implication dans l'activation indirecte des NK lors de l'infection de PBMC par le virus de la grippe.

Ce travail est un exemple des apports de la puissance de la cytométrie multi-paramétrique associée à des outils bio-informatiques pour explorer des systèmes cellulaires complexes. Il suggère son application comme outil de découverte dans de nouveaux systèmes complexes au carrefour de l'immunologie et de la virologie.



II.2 INVESTIGATION OF THE PHENOTYPE OF TAP-DEFICIENT NATURAL KILLER (NK) CELLS BY 13-COLOR FLOW CYTOMETRY

M. Sleiman(1,2,), N.H.C. Brons(3), J. Flies(1), F. Hentges(1) and J. Zimmer(1)*

(1) CRP-Santé, Laboratory of Immunogenetics-Allergology (LIGA), Luxembourg

(2) University of Luxembourg, Luxembourg

(3) CRP-Santé, Flow Cytometry Core Facility (CFC), Luxembourg

(* Correspondence: marwan.sleiman@crp-sante.lu

Natural killer (NK) cells are lymphocytes of the innate immune system that are involved in early defense mechanisms and can kill tumor and infected target cells without prior activation. Their function is controlled by a dynamic balance between activating messages transmitted by their activating receptors (AR) and inhibitory signals transmitted by their inhibitory receptors (IR). Some of these molecules are called KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors). Other IR include ILT2 and NKG2A.

Since their original description in 1975 by Kiessling, our understanding of their role in immunology has gradually expanded. Complexity and diversity of NK cell functions are generated at many levels ranging from variation in the genes of different individuals to the multiple activating and inhibitory receptor:ligand interactions and diversity of signaling molecules. Owing to their diversity and that of their MHC class I ligands, there has been much investigation into their relationship to an array of diseases including viral infections, tumors, autoimmunity and pregnancy-related disorders. However, difficulties to identify rare or heterogeneous cell populations can be limiting.

Recent studies showed that the expression of at least one IR specific for an autologous MHC class I molecule is necessary for the NK cell to become functional. This process is called NK cell "education" or "licensing". NK cells not expressing such an IR are hyporesponsive to stimulation via activating receptors.

Our lab is interested in the study of NK cells derived from TAP-deficient (Transporter Associated with Antigen Processing) patients. Such deficiency leads to a very weak expression of MHC class I molecules on the cell surface (up to 100 fold less than the normal level). In the majority of these patients, NK cells are not functional as their education is missed due to the absence of MHC class I ligands for IR.

In order to investigate the co-expression of IR and see the effect of different IR combinations (KIR, ILT2, NKG2A) and maturity markers on NK functions, we undertook a very detailed phenotypic study of the different IR expressed by NK cells in TAP-deficient patients and normal donors. These studies are performed on a FACS Aria (BD Bioscience) and consist of a single 13-color staining of PBMC. Dead cells, monocytes, T and B lymphocytes are gated out, and then different NK subpopulations are investigated, based on CD16/CD56 expression, regarding their IR expression and also different markers which were described in recent publications as NK subpopulations' markers. This method enables us to perform a very deep and fine analysis of the NK IR repertoire in both normal donors and TAP-deficient patients (up to 7 different markers in one experiment). As MHC and KIR genotyping were performed, we can determine NK cells expressing self-specific IR.

Following these investigations, functional studies were performed: IFN γ secretion and degranulation (expression of CD107a) after contact with tumor cells (K562, MOLT-4 and A549 cell lines), in order to determine each NK subpopulations' properties.

These studies (combined with proliferation assays, in vivo experiments and microarrays) should teach us more about the effect of the MHC-I environment on NK cells' education.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP9-2 : FORUM DES TECHNICIENS



I-1. PLACE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC D'UN SYNDROME MYELODYSPLASIQUE

S Demartin, B. Husson, A. Dubois, O. Fontanella, G. Detry,

CH Jolimont, Haine Saint Pierre, Belgique

L'utilité d'une analyse en cytométrie en flux est actuellement reconnue dans l'exploration des néoplasies lymphoïdes B et dans l'assignation de lignée des leucémies aiguës peu différenciées. D'autres applications bien définies telles que la mise en évidence d'un clone d'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne ou encore l'étude des marqueurs plaquettaires sont également régulièrement appliquées sur des cytomètres en flux.

Restreinte à l'étude des syndromes myélodysplasiques, l'analyse en cytométrie en flux permet à tous les laboratoires de quantifier l'importance d'une population blastique. La mesure de cette proportion est d'autant plus intéressante que la distribution des blastes est peu homogène. Depuis quelques années, l'utilisation de cytomètres en flux multicolores qui permettent l'étude simultanée de nombreux antigènes exprimés sur ou dans une cellule, nous permet d'étudier l'expression de ces antigènes sur les différentes populations cellulaires à différents stades de maturation. Cette nouvelle application nécessite un changement radical dans l'analyse visuelle des images fournies par le cytomètre. Il ne s'agit plus d'étudier des pourcentages de cellules positives pour un marqueur mais bien d'apprécier le positionnement d'un nuage de points représentant une population donnée à un stade précis au cours du processus maturatif.

Cette nouvelle visualisation permet de mettre en évidence des positionnements aberrants des populations cellulaires aux cours de syndromes myélodysplasiques. Les expressions anormales peuvent être de plusieurs natures : expression de protéines exprimées habituellement sur d'autres lignées, sous-expression ou sur-expression d'un marqueur sur une population donnée à un stade de maturation donné, absence d'hétérogénéité d'expression d'un marqueur ou encore modification cellulaire entraînant une modification de la lumière retransmise et diffractée.

Dans la littérature et dans notre expérience personnelle, cette approche s'est révélée comme étant aussi efficace que la morphologie dans l'évaluation de la dysplasie sur les cellules médullaires. Elle peut apporter une aide décisive dans les cytopénies idiopathiques sans anomalie morphologique et elle pourrait également argumenter en faveur d'une dysplasie multilignée dans les syndromes myélodysplasiques de bas grade. Elle permettrait de plus l'étude de populations peu ou pas appréciables en morphologie comme la maturation des monocytes, des lymphocytes B, des mastocytes ou encore du micro-environnement. Des études prospectives sont nécessaires pour prouver l'impact de cette approche dans le diagnostic de syndromes myélodysplasiques.

.../...



.../...

Cette application, bien que prometteuse et efficace, se heurte néanmoins à quelques difficultés. L'interprétation des résultats entre différents centres, parfois au sein même d'un centre, est souvent rendue difficile par les points suivants ; manque de standardisation des approches (cytomètres différents, combinaisons différentes, réglages différents), maigre efficacité des contrôles sur la stabilité du cytomètre, connaissances nécessaires pour l'interprétation des données (pureté de la population étudiée, variation physiologique dans les profils d'expression étudiés), circonstances qui pourraient expliquer le phénotype observé, (température, délai de conservation, anticoagulant, administration de GCSF, régénération, inflammation). Enfin le rapport cout-bénéfice de cette approche doit encore être évalué.



I-2. EXPLORATION DU DÉFICIT EN GRANULES DENSES PLAQUETTAIRES PAR LE TEST À LA MÉPACRINE : STANDARDISATION DE LA MÉTHODE.

Nicolas Bailly¹, François Mullier^{1,2,3}, Véronique Latger-Cannard^{4,5}, Yvan Cornet¹, Claire Loosen¹, Jean-Michel Dogné^{2,3}, Bernard Chatelain^{1,3}, Thomas Lecompte^{4,5}

¹Hematology Laboratory, UCL Mont-Godinne, Yvoir, Belgium;

²Department of Pharmacy, Drug Design and Discovery Center, FUNDP, University of Namur, Namur, Belgium

³Namur Thrombosis and Haemostasis Center (NTHC), Namur, Belgium

⁴CHU Nancy, Service d'hématologie biologique, Nancy, France

⁵Centre de Compétence Nord-Est des Pathologies Plaquettaires CCPP, France

Introduction :

Le syndrome qui affecte les granules denses plaquettaires est probablement un des troubles plaquettaires le plus fréquent mais le plus sous-diagnostiqué. Il existe cependant de nombreuses méthodes pour mettre en évidence cette pathologie. Le test rapide utilisé en CMF utilise la mépacrine (un dérivé fluorescent d'acridine) qui possède la capacité de se lier avec une forte affinité aux nucléotides d'adénine présents dans les granules denses des plaquettes. Malheureusement, aucune standardisation de la méthode n'a été développée jusqu'à présent.

Objectifs et résultats:

Durant cette présentation, l'optimisation des différentes variables préanalytiques, analytiques et postanalytiques ayant permis d'aboutir au protocole (Tableau 1) sera présentée. Le protocole développé sur le FACSCantoII et le FACS AriaI a été validé avec les prélèvements de 20 sujets sains et 30 sujets avec possible tendance hémorragique favorisée par une thrombopathie.

Finalement, un contrôle externe sera aussi proposé.

Conclusions :

Le test à la mépacrine en CMF permet le diagnostic rapide des déficits des grains denses plaquettaires.

.../...



.../...

Diluer 20x le sang total dans du PBS							
	Compensation	Capture			Libération		
	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7
	Compensation	Capture autofluorescence	Capture à 7,6µM	Capture à 15,2µM	Libération Autofluorescence	Libération à 7,6µM	Libération à 15,2µM
Sang dilué	300µL	300µL	300µL	300µL	300µL	300µL	300µL
TRAP 1mM	---	---	---	---	6µL	6µL	6µL
Mélanger doucement et incuber exactement 15 minutes à température ambiante							
CD41-PE	---	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL
Mépacrine à 7,6µM	20µL	---	20µL	---	---	20µL	---
Mépacrine à 15,2µM	---	---	---	20µL	---	---	20µL
Incuber 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière							
Ajouter 2500µL de PBS et analyser en CMF							

Tableau 1 : Protocole pour le test à la mépacrine.



I-3. IMMUNOCOMPTAGE PLAQUETTAIRE : COMPARAISON TECHNIQUE SIMPLE PLATEFORME ET DOUBLE PLATEFORME

Claire Loosen⁽¹⁾, Maxime Depoorter⁽¹⁾, Ludivine Monmart⁽¹⁾, Nicolas Bailly⁽¹⁾, Yvan Cornet⁽¹⁾, François Mullier⁽¹⁾, Jean-Claude Osselaer⁽²⁾, Bernard Chatelain⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratoire d'hématologie, CHU Mont-Godinne, Yvoir, Belgique

⁽²⁾Centre de transfusion, CHU Mont-Godinne, Yvoir, Belgique

La présence de fragments de globules rouges ou de plaquettes de grande taille dans un échantillon sanguin peut constituer une difficulté pour un analyseur d'hématologie à déterminer la concentration plaquettaire sur cet échantillon. Dans ce contexte, le recours à la méthode de référence peut être utile. La microscopie en contraste de phase comme méthode de référence pour la numération plaquettaire a progressivement été remplacée par une méthode immunologique en cytométrie en flux. Une technique en double plateforme est recommandée: la numération plaquettaire est obtenue par le ratio entre le nombre de plaquettes marquées par un anticorps couplé à un fluorochrome et le nombre de globules rouges mesurés sur le cytomètre, multiplié par la concentration en globules rouges fournies par un analyseur d'hématologie. Cette méthode a l'inconvénient d'être tributaire de la précision de la numération des érythrocytes sur l'analyseur d'hématologie et n'est pas adaptée à la quantification des concentrés plaquettaires. Grâce à sa pompe péristaltique et à un système de contrôle du volume aspiré, le cytomètre en flux Accuri C6 est capable de fournir directement une concentration cellulaire absolue. Cette méthode en simple plateforme présente l'avantage de ne pas requérir la présence de globules rouges ni l'utilisation de billes de calibration dont la vitesse de sédimentation peut être différente de celle des cellules analysées. L'évaluation de la linéarité, de la reproductibilité et de l'exactitude de la technique à la fois sur sang total, sur plasma riche en plaquettes et sur concentré plaquettaire sont indispensables pour la validation de l'utilisation de l'Accuri C6 pour la numération plaquettaire en cytométrie en flux dans un laboratoire de biologie clinique ou de transfusion.



I-4. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX DROGUES (MDR) AVEC LA SONDE JC-1 DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES (LAM)

R.Lautier, J.Y. Perrot, O.Legrand, J.P. Marie

Service d'Hématologie et Immunologie Biologiques (Luc Douay) et Service d'Hématologie, Clinique Hôpital Saint-Antoine Paris.

La Résistance Multiple aux Drogues (MDR) est liée à l'expression membranaire de protéines capables de fixer des molécules toxiques naturelles ou médicamenteuses et de les transporter activement en dehors de la cellule. La protéine la plus souvent impliquée dans la MDR des cellules leucémiques humaines est la P-gp (Permeability glycoprotéine) ou ABCB1, détectable sur la membrane cellulaire. La détection de la MDR par un test fonctionnel a l'avantage de rechercher une mesure prédictive de la réponse au traitement et à l'utilisation d'éventuels « révertants » de la MDR. De plus, la sensibilité faible et le manque de spécificité de la détection immunologique de la P-gp font que son utilisation en routine clinique est de moindre intérêt.

L'utilisation de la sonde JC-1 pour mesurer la fonctionnalité de la P-gp à la place de la rhodamine classiquement utilisée permet de simplifier le test et son interprétation. En effet, la double fluorescence obtenue lors de l'accumulation de JC-1 dans les mitochondries permet de contrôler l'incorporation de la sonde ; la disparition rapide de la double fluorescence lorsqu'un efflux est effectif permet la quantification directe et sensible de la MDR. La rapidité du test et son adaptabilité aux techniques de routine en cytométrie multi-couleurs permet d'inclure plus facilement la mesure de la MDR dans le typage de routine des Leucémies Aigues.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP11 : BIOLOGIE VÉGÉTALE



I-1. CYTOMETRY APPROACHES AS TOOLS TO DECIPHER THE FUNCTIONAL ROLE OF ENDOPOLYPLOIDY

Nathalie Frangne⁽¹⁾, Matthieu Bourdon^(1,2), Julien Pirrello⁽²⁾, Catherine Cheniclet⁽²⁾, Spencer C. Brown⁽³⁾, Mickaël Bourge⁽³⁾, Olivier Coriton⁽⁴⁾, Christel Poujol⁽⁵⁾, Martine Peypelut⁽⁶⁾, Valérie Rouyère⁽¹⁾, Adeline Moïse⁽²⁾, Jean-Pierre Renaudin⁽¹⁾ and Christian Chevalier⁽²⁾

⁽¹⁾Université Bordeaux 1, UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon, France

⁽²⁾INRA, UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon, France

⁽³⁾CNRS, Centre de Recherche de Gif, Institut des Sciences du Végétal, UPR2355, Bâtiment 23/24, F-91198 Gif-sur-Yvette, France

⁽⁴⁾INRA, Plate-forme de Cytogénétique Moléculaire Végétale, UMR118 Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, BP 35327, F-35653 Le Rheu, France

⁽⁵⁾Bordeaux Imaging Center, UMS 3420-CNRS-INSERM-Université Bordeaux Segalen, Photonic Imaging Pole, Institut des Neurosciences François Magendie, 33076 Bordeaux, France

⁽⁶⁾INRA, Bordeaux Imaging Center, UMS 3420-US4, Plant Imaging Pole, 71 av. E. Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon, France

Endopolyploidy is a widespread process which corresponds to the amplification of the genome in the absence of mitosis. It occurs in a majority of eucaryotes and accompanies organ and cell differentiation. So far the physiological role of this process during plant development is not fully understood. Deciphering the functional roles of endopolyploidy is hampered by the fact that polyploid tissues generally comprise cells with various ploidy levels. In some fleshy fruits (amongst them tomato fruit) the ploidy levels present at the end of development range from 2C to 256C in the same tissue. Fruit of species that display endopolyploidy tend to develop much faster (1). Investigating the temporal and spatial distribution of this phenomenon in a tissue is an important step towards understanding its role. Therefore, it is necessary to address the DNA content of individual nuclei *in situ*.

In this context we used pericarp tomato nuclei sorted by flow cytometry according to ploidy levels from 2 to 128C and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to develop a new method that allows the *in situ* determination of the DNA ploidy level of individual nuclei (2). This method allowed the mapping of endopolyploidy in pericarp from mature green fruit. Our results indicate that ploidy level is not only dependent on cell size but also relies on cell position within the pericarp. Then this *in situ* determination of ploidy level in tomato pericarp allowed a structural analysis of polyploid nuclei at the level of chromatin and nucleolar organization, nuclear shape and relation with other cellular organelles such as mitochondria. We demonstrate that endoploidization strongly affects the nuclear structure in tomato. In mesocarp cells, displaying high ploidy levels, the nuclei possess a highly complex shape with numerous deep grooves, allowing them to maintain a constant area to perimeter ratio despite their increase in volume. Numerous mitochondria are observed in close vicinity to polyploid nuclei. These numerous grooves might facilitate mRNA export to the cytoplasm.

.../...



.../...

Our FISH method applied to isolated nuclei sorted by flow cytometry according to ploidy level demonstrates that endopolyploidy leads to the formation of polytene chromosomes. The duplication of a selected set of marker genes according to ploidy level was confirmed by qPCR on genomic DNA. Moreover, using an RNA FISH method, we showed that endopolyploidy leads to increased rRNA transcription.

Our study demonstrates an innovative method for determining ploidy levels directly in plant tissue samples. It reveals endopolyploidy as a highly structured supra-cellular system, whose complexity can now be addressed in terms of both cell growth and gene regulation during tomato fruit development.

1. Chevalier et al. (2011) Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Ann. Botany* **107**:1159-1169
2. Bourdon et al. (2011) *In planta* quantification of endopolyploidy using Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). *Plant J* **66**: 1089-1099



I-2. CHLOROPLAST/NUCLEUS INTERACTIONS AND CELL CYCLE REGULATION IN ARABIDOPSIS

Cécile Raynaud⁽¹⁾, Séverine Domenichini⁽¹⁾, Moussa Benhamed⁽¹⁾, Mick Bourge⁽²⁾, Elodie Hudik⁽¹⁾, Sophie Blanchet⁽¹⁾, Olivier Catrice, Spencer Brown⁽²⁾ and Catherine Bergounioux⁽¹⁾

⁽¹⁾ Institut de Biologie des Plantes, UMR CNRS 8618, Orsay, France

⁽²⁾ Institut des Sciences du Végétal, CNRS UPR 2355, Gif-sur-Yvette, France

(cecile.raynaud@u-psud.fr)

Chloroplasts arose from an endosymbiosis between a eucaryotic cell and a photosynthetic cell related to cyanobacteria. Because of their evolutive origin, chloroplasts cannot be produced de novo by plant cells but divide by binary fission. In unicellular algae containing only one or a few chloroplasts, the need for a strict regulation of chloroplast division during the cell cycle is obvious. By contrast, in multicellular plants, this correlation is looser because cells contain several chloroplasts. Nevertheless, their number seems to be strictly controlled depending on the cell type, suggesting that cell cycle and chloroplast division are coordinated in higher plants. To investigate this relationship, we identified proteins predicted to be targeted both to chloroplasts and to the nucleus, and playing a role in cell cycle regulation. This drew our attention to AtCDT1a, a conserved protein in all eucaryotes required for S-phase entry, which can accumulate in plastids as well as in the nucleus. Using a RNAi approach, we showed that AtCDT1a plays a role in cell cycle regulation and chloroplast division. Various cytometry analyses allowed us to show that cell cycle progression, chloroplast size and chloroplast DNA content are modified in these plants. Measurements of pollen grain DNA content in *cdt1a* hemizygous mutants also allowed us to shed light on the role of this protein in gametophyte development.

Another issue is to determine whether plastid derived signals may influence cell cycle regulation. To address this question, we are currently characterizing cell cycle regulation in the crumpled leaf mutant, in which both cell division and chloroplast division are altered. Flow cytometry after EdU incorporation allowed us to quantify DNA replication in the mutant, and to show that impairment of cell cycle progression in *crl* is partly alleviated by sucrose.

Taken together, our results suggest that chloroplast division is regulated during the cell cycle in higher plants, and reciprocally, that chloroplast-derived signals can modulate cell cycle progression.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

**P2 SESSION PLENIERE :
HÉMATOLOGIE 2**



I-1. BIOLOGICAL MICRO-NANOPARTICLES : TECHNOLOGICAL AND CLINICAL ADVANCEMENTS

François Mullier^{1,2,3}, Jean-Michel Dogne^{2,3}, Christian Chatelain^{3,4}, and Bernard Chatelain^{1,3}

¹ Hematology Laboratory, CHU Mont-Godinne, Université Catholique de Louvain, Yvoir, Belgium;

² Department of Pharmacy, FUNDP, University of Namur, Namur, Belgium;

³ Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC) - NARILIS, Namur, Belgium;

⁴ Hematology Department, CHU Mont-Godinne, Université Catholique de Louvain, Yvoir, Belgium;

Biological micro-nanoparticles, often grouped into microvesicles (MVs), are small membrane vesicles shed from normal and/or tumor cells following activation or apoptosis. Microvesicles are defined by size, concentration, morphology, biochemical composition, cellular origin and activity. Definition of MVs is not generally accepted due to technological limitations in size measurement.

Based on the size and mechanism of synthesis, MVs are currently divided into exosomes and microparticles (MPs). Exosomes are released from cells containing multivesicular bodies when the membranes of multivesicular bodies fuse with the plasma membrane. Their diameter ranges between 30 and 100 nm. MPs are released from the plasma membrane during “budding” or “shedding” and have a size between 100 nm and 1 µm.

MVs are now thought to play a major role in coagulation, inflammation, cell communication, cancer cell survival, invasiveness and metastasis as well as in stem cell renewal and expansion.

Consequently, MVs have high potential as diagnostic biomarkers. Numerous techniques have been described to detect and/or characterize the MVs. However, no single technique is able to provide all MV characteristics. For example, flow cytometry (FCM) which is the most used technique to detect, size and count MVs, suffers from lack of sensitivity to small-sized MVs and gives no information on the tissue factor and/or phospholipids-mediated procoagulant activity. Standardization of the analysis of the largest MVs by FCM is ongoing thanks to the use of submicron beads (Megamix) into the subcommittee Vascular Biology of the International Society of Thrombosis and Hemostasis.

The absence of a standard biological control and generic MV marker makes comparison of results provided by different techniques and instruments difficult. Among other, a difficulty with FCM is that the relation between the measured light scattering and the diameter of vesicles is unknown, resulting in debates on the standardization of vesicle detection. Finally, the potential overlap between parameters of protein complexes and MVs, might perturb detection and/or isolation of MVs. Recently, high-sensitive techniques like Atomic Force Microscopy (AFM) have opened new perspectives in biomedical research for the investigation of bioparticles. The advantage of this technique is that high-resolution topography imaging of particles can be obtained with a resolution down to the subnanometer range. Moreover, the ability of AFM to image biological samples in aqueous fluids enables the preservation of sample properties in their physiological state. Pre-analytical steps during

.../...



.../...

blood sampling, MVs isolation and storage are indeed critical parameters for MPs characterization. Centrifugation protocol for MVs isolation and stirring during sample transportation appear to be among the most important preanalytical variables.

The validation and standardization of techniques that could be used to determine the MVs characteristics is more than ever needed before studying the diagnostic and prognostic impacts of MVs in prospective clinical trials. Some of the potential future clinical applications of MVs measurements will also be presented during this talk (ie: heparin-induced thrombocytopenia, cancer and transfusion).



I-2. INTERET DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS L'EVALUATION DU PRONOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES

F. Féger

Laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie Biologiques, Hôpital Saint Antoine, Paris

Les progrès thérapeutiques accomplis dans le domaine des leucémies aiguës (LA) ont reposé sur le développement de nouvelles molécules cytotoxiques, l'amélioration de la prise en charge des phases d'aplasie, des infections et de la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Une nouvelle voie est actuellement explorée qui cherche à adapter le traitement au risque encouru.

Cette évaluation du risque prend en compte des paramètres corrélés à l'évolution clinique des patients traités, des facteurs pronostiques, tels le nombre de globules blancs, les LDH sériques, l'âge du patient et son état général, le caryotype, les marqueurs moléculaires, etc.. Quelques-uns peuvent être appréciés par la cytométrie en flux.

Certains peuvent être évalués au moment du diagnostic, tels l'expression aberrante de certains antigènes (CD7, CD56, CD25 dans les LAM) décrite comme associée à une évolution défavorable par certaines équipes, l'index d'ADN reconnu dans le cas des LAL de l'enfant et complémentaire de la ploïdie, l'évaluation fonctionnelle de transporteurs membranaires (Pgp et famille ABC dans les LAM), le nombre de cellules CD34+ CD38-.

D'autres présentent un intérêt pronostique après le diagnostic au cours du suivi de la réponse au traitement, telle la mesure de la maladie résiduelle minimale (MRD). Mesurée à différents temps du traitement, celle-ci est reconnue comme un facteur pronostique indépendant. Elle évalue précocement i) l'efficacité du traitement par le suivi de la décroissance de la population blastique, ii) la résistance des blastes aux molécules cytotoxiques *in vivo*, iii) le risque de rechute, généralement proportionnel au niveau de MRD détecté. Toutefois, la valeur de la mesure de la MRD, fondée sur la détection de l'expression de certains profils antigéniques (LAIP) par les cellules blastiques, est pondérée par un relatif défaut de spécificité de certains profils. Aussi, le suivi de la population de cellules leucémiques souches, caractérisées à la fois par le profil LAIP mais aussi par certains antigènes, considérés comme propres aux cellules souches leucémiques tels CD123, CD96, ou CLL-1, pourrait permettre d'améliorer la spécificité de la mesure de la MRD. De même, la découverte de nouveaux antigènes surexprimés de façon stable par les cellules leucémiques par rapport aux progéniteurs physiologiques combinée au développement de la cytométrie en 6 à 10 couleurs permettra d'améliorer la spécificité et la sensibilité de détection de la maladie résiduelle.

Enfin, l'exploration de voies de signalisation impliquées dans la prolifération ou l'apoptose des cellules blastiques, par les techniques de phosphoflow, pourrait à la fois enrichir nos connaissances de physiopathologie, affiner l'évaluation du risque de résistance au traitement et révéler des cibles thérapeutiques.

Applicable à environ 90% des cas de LA, la mesure de la MRD par la cytométrie en flux est intégrée dans les stratégies d'évaluation du risque dans les études cliniques récentes chez l'enfant dans les cas de LAL et de LAM afin d'évaluer son intérêt comme paramètre de décision thérapeutique.



I I-1. QUANTIFICATION OF MICROPARTICLES BY FLOW CYTOMETRY IN WHOLE BLOOD: APPLICATION TO THE DIAGNOSIS OF HEREDITARY SPHEROCYTOSIS.

Nicolas Bailly¹, François Mullier^{1;2;3}, Jean-Michel Dogné^{2;3}, Christian Chatelain^{3,4}, Bernard Chatelain^{1;3}

¹Hematology Laboratory, UCL Mont-Godinne, Yvoir, Belgium;

²Department of Pharmacy, Drug Design and Discovery Center, FUNDP, University of Namur, Namur, Belgium

³Namur Thrombosis and Haemostasis Center (NTHC), Namur, Belgium

⁴Hematology Department, UCL Mont-Godinne, Yvoir, Belgium

Introduction: Microparticles (MP) are submicron vesicles released from cell membranes due to activation or apoptosis. As shown in our previous studies, MPs are known for having a high potential as diagnostic biomarkers in such diseases like Hereditary Spherocytosis (HS), type II-Heparin Induced Thrombocytopenia (HIT) and cancers.

However, standardizations of their analysis and quantification by Flow Cytometry (FCM) are limited by preanalytical steps and sensitivity of the method. One of the most preanalytical variables is the centrifugation which could affect the MP's quantification and activity. Its effect is even more important after freezing due to MP's release by residual platelets during the freezing-thawing process.

By establishing a method to enumerate MP by FCM in whole blood, we avoid the problems linked to centrifugation steps.

Methods: After validating the flow stability through time in our flow cytometer, the exact low flow rate has been defined according to an adaption of the protocol from C. Walker and D. Barnett.

Then, the coincidence and the electronic abort effects have been evaluated. by running serial dilutions of i) Invitrogen 1000nm FluoSpheres® Carboxylate-modified microsphere, yellow/green (beads) and ii) a mix between beads and citrated 109mM whole blood previously incubated with CD41-PE on BD FACSAriaI. Each run has been repeated ten times to evaluate the repeatability.

Finally, the working conditions determined previously were used on whole blood samples from healthy subjects (n=8), HS (n=4), PNH (n=2), HIT (n=2), Sickle Cell Disease (SCD) (n=2) and other haemolytic anaemias (n=8) labelled with antiCD41-PerCP-Cy5.5 and antiCD235a-PE to define Red Blood Cell Derived Microparticles (RBC MPs) and Platelet Derived Microparticles.

The size of the MPs were defined on FCM by using a blend of monodisperse fluorescent beads (Megamix, BioCytex, Marseille, France) according an inter-laboratory study coordinated by ISTH subcommittee.

.../...



.../...

Results: The flow rate remains constant at mean 6.9 μ L/minute with a coefficient of variation of 2.4%. A 200 fold dilution of whole blood allows getting electronic abort and CV lower than 15% and 2%, respectively.

Finally, preliminary data on a small group of patients indicate that HS induced the release of significantly more RBC MPs (mean= 54,170/ μ l, standard error (SE)= 8,409/ μ L,) than healthy subjects (mean= 14,900/ μ l, SE= 2,785/ μ L), PNH (mean= 3,631/ μ l, SE= 1,583/ μ L), HIT (6,183/ μ l, SE=786/ μ L), SCD (32,620/ μ l, SE= 6,584/ μ L) and other haemolytic anemias (13,910/ μ l,SE= 1,939/ μ L).

Conclusions: MP quantification in whole blood could be used to avoid problems linked to centrifugation and to contribute to the diagnosis of diseases like HS.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

**SESSION
JEUNES CHERCHEURS**



I-1. RECONCILIER EdU ET GFP : YES WE CAN!

M. Bourge⁽¹⁾, *C. Fort*⁽²⁾, *M-N. Soler*⁽¹⁾, *B. Satiat-Jeunemaître*⁽²⁾, *S.C. Brown*⁽²⁾

⁽¹⁾IFR87 La plante et son environnement, et Imagif, ⁽²⁾Institut des Sciences du Végétal, CNRS, bât. 23, ave de la Terrasse, 91198-Gif-sur-Yvette cedex, France (mick.bourge@isv.cnrs-gif.fr)

Avec l'incorporation d'EdU (5-ethynyl-2'-déoxy-uridine, analogue de la thymidine), la réaction de cyclo-addition azide-alkyne catalysée par le cuivre (**click-reaction**), révélée par l'utilisation d'un fluorochrome (AlexaFluor), peut être utilisée pour une analyse précise du cycle cellulaire en combinaison avec un marqueur nucléaire (DAPI, IP). Sur cellules, tissus ou organismes entiers, ce protocole est bien plus simple, rapide et robuste comparé à l'utilisation de bromo-déoxyuridine (BrdU). Mais le catalyseur cuivré tend à diminuer l'émission de fluorescence des protéines dérivées de la GFP, ayant pour conséquence de limiter ses applications ou de donner des résultats non reproductibles. Nous avons modifié ce protocole **click-reaction**, dépendant du Cu^I , de manière à chélater tout le cuivre par un lavage EDTA acide avant un retour à neutralité propice aux protéines fluorescentes.

Nous proposons ensuite une stratégie générale, un pulse-chasse par photo-activation (PAPC, **Photo-Activated-Pulse-Chase**) combiné avec l'EdU afin d'obtenir, par cytométrie, un taux de synthèse d'une protéine cible au cours du cycle cellulaire. La masse relative de la membrane trans-golgienne peut être suivie par l'expression d'une protéine de fusion motif-transmembranaire Sialyl-Transferase::Kaede (ST-Kaede), photo-convertible (Brown *et al.* Plant J. 2010). En début d'expérience, Kaede, protéine fluorescente initialement verte, est convertie dans sa forme rouge en exposant la culture cellulaire à une irradiation violette. Pendant la cinétique d'étude, les protéines néo-synthétisées apparaissent en vert. On mesure ainsi le rapport Vert/Rouge pour obtenir le taux de synthèse relative cellule-par-cellule.

Avec ces nouveaux protocoles, nous montrons que chez les cellules BY2, le taux de synthèse de protéines golgiennes est fort en G1, ralenti de fin G1 à S, avec une forte diminution en G2.

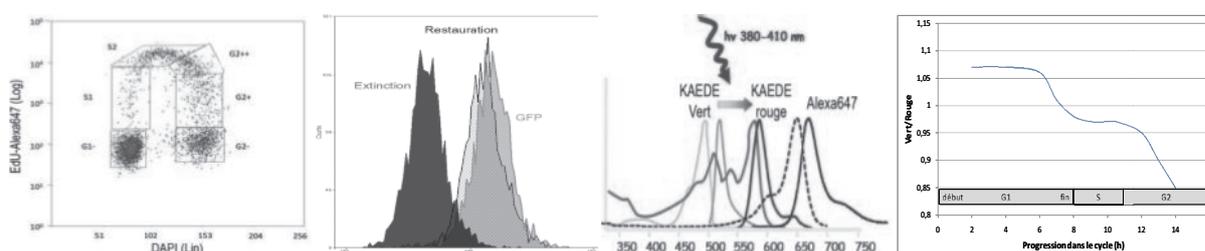


Figure : EdU et GFP, la réconciliation

a, Noyaux de cellules de tabac BY2 marqués avec DAPI (abscisses) et EdU révélé par Alexa Fluor 647 (ordonnées). b, Fluorescence de la GFP (gris), son extinction par la réaction click (Cu^I) (noir), et restauration de la fluorescence GFP par EDTA acide après la réaction click (blanc). c, Spectres d'excitation et d'émission de Kaede vert, de Kaede rouge après photoconversion par le laser violet, et de l'Alexa Fluor 647. d, Taux de synthèse de la protéine Golgienne ST-Kaede (forme verte / forme rouge) en fonction de la progression dans le cycle cellulaire (heure).



I-2. DETECTION OF PLATELET-DERIVED MICROPARTICLES: AN ALTERNATIVE STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS OF TYPE-II HEPARIN-INDUCED THROMBOCYTOPENIA

Mullier F^{1,2,3}, Bailly N¹, Cornet Y¹, Robert S², Osselaer JC⁴, Chatelain C^{3,5}, Elalamy I⁶, Dogné JM^{2,3}, Chatelain B^{1,3*}*

¹ Hematology Laboratory- Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), UCL Mont-Godinne, Yvoir, Belgium

² Department of Pharmacy- NARILIS, FUNDP, University of Namur, Namur, Belgium

³ Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Namur, Belgium

⁴ Blood Transfusion Center, UCL Mont-Godinne, Yvoir, Belgium

⁵ Hematology Department-NARILIS, UCL Mont-Godinne, Yvoir, Belgium

⁶ Hematology Department, Hôpital Tenon, Paris, France

* Contributed equally

Abstract

Background: Early type II heparin-induced thrombocytopenia (HIT) diagnosis is essential to improve clinical outcomes but remains challenging. The release of procoagulant platelet microparticles (PMPs) is considered as the major step of HIT.

Objectives: The aim of this pilot study is to compare PMP generation assay (PMPGA) performance with ELISA, Light Transmission Aggregometry (LTA), ¹⁴C-Serotonin Release Assay (SRA) and clinical outcomes.

Methods: Sera or citrated-platelet-poor plasma of HIT-suspected patients (n=72) were incubated with citrated-whole blood from healthy donors with/without unfractionated heparin (UH: 1 or 500 IU/ml). PMPs were quantified and characterized using a FACS Aria[®] flow cytometer. ELISA (PF4 Enhanced[®]), LTA, PMPGA, SRA and clinical outcomes data were compared by Chi-Square tests and ROC Curves.

Results: In positive HIT patients, PMPs expressing phosphatidylserine (PS+) are generated following immune complexes formation with low UH concentration whereas PMP rate decreases significantly in presence of high UH concentration. We propose to consider the ratio of PMPs PS+ between low and high heparin concentrations with an optimal cut-off ratio determined at 2. The correlation between PMPGA and SRA is markedly more significant (p<0.0005, n=57 including 10 positive SRA) than LTA (p=0.0267, n=39), and ELISA (p=0.0022, n=58). Sensitivity and specificity of PMPGA were 70.0 and 97.7%, respectively, calculated with SRA as reference. Combining clinical outcome to biological testing, PMPGA sensitivity and specificity reached 100 and 88.9%, respectively.

Conclusions: Given its excellent correlation with ¹⁴C-SRA performance and clinical outcome, PMPGA can be considered as the new biological reference confirmation assay of HIT.



I-3. FETAL PROGENITOR CELLS NATURALLY TRANSFERRED THROUGH PREGNANCY PARTICIPATE IN INFLAMMATION AND ANGIOGENESIS DURING WOUND HEALING.

*Dany Nassar (1, 2), Kiarash Khosrotehrani (1,2,3, *), Selim Aractingi (1, 2, 4, *)*

- (1) Université Pierre et Marie Curie- Paris 6, UMR 938, Paris France
- (2) INSERM, U938, Saint Antoine Research Centre, Paris, France.
- (3) The University of Queensland, UQ Centre for Clinical Research, Brisbane, Australia
- (4) Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Department of Dermatology, Paris, France

* KK and SA contributed equally as senior author.

Correspondence to: Dany Nassar, MD

INSERM UMR_S 938, centre de recherche Saint Antoine, laboratoire des cellules souches fœtales, 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France
Tel: +33140011365 Fax: +33140011423
Email: dany.nassar@inserm.fr

Abbreviations: WT: Wild type; GFP: enhanced Green Fluorescent Protein; vWF: von Willebrand factor; Bleo: Bleomycin; PBMC: peripheral blood mononuclear cell

Abstract

PURPOSE: The phenotype and fate of fetal microchimeric cells transferred into the maternal circulation during pregnancy is not well described. Since progenitors from distal sites mobilize during wound healing, we analysed the recruitment and plasticity of fetal progenitors into maternal wounds.

PROCEDURES: Wounds were generated on normal and bleomycin-induced fibrotic skin of wild-type females pregnant with fluorescent GFP+ fetuses. Analyses were performed on skin and blood specimens through PCR, immunohistochemistry and flow cytometry to detect GFP+ fetal cells. Controls consisted of pregnant females without wounds and virgin females with wounds.

FINDINGS: GFP + fetal cells were detected in all skin specimens of pregnant mice –by immunofluorescence, PCR and FACS analysis– as long as healing was not achieved. During early stages of wound healing, fetal cells expressed mainly a leukocyte marker (CD45) while in later phases endothelial markers (CD31, von Willebrand factor) prevailed. Vessels derived from GFP+ fetal cells and connected to maternal circulation were also found in maternal wounds, demonstrating the transfer of fetal endothelial progenitor cells. The phenotype of fetal endothelial progenitors mobilised by maternal wound healing was analysed by FACS of the maternal peripheral blood mononuclear cells: wounding mobilised fetal CD34+ckit- cells into the blood during pregnancy; most of this population was CD11b-VEGFR2-; another part was CD11b+ with a fraction expressing VEGFR2. This suggests a novel phenotype for fetal endothelial progenitor cells, different from that has been previously described in the literature. VEGFa-spiked Matrigel plugs were implanted in the subcutis of pregnant females with GFP+ fetuses in order to assess the responsiveness of fetal endothelial progenitor cells to VEGFa signalling. Using FACS analysis, GFP+ fetal CD31+ cells were detected in VEGFa-spiked matrigel. Moreover, VEGFa mobilised fetal CD34+ckit- cells into the blood during pregnancy; most of this population was CD11b-VEGFR2-; another part was CD11b+ with a fraction expressing VEGFR2. This phenotype of fetal progenitor cells mobilised by VEGFa was similar to that found after wound healing.

.../...



.../...

Conclusion: Fetal cells that mobilise in response to maternal wounding during pregnancy are mainly progenitor cells and participate to angiogenesis and inflammation. Fetal endothelial progenitors mobilised in the maternal blood after wound healing or VEGFa chemotaxis display a novel phenotype.

Key words: Fetal stem cells, microchimerism, angiogenesis, inflammation, wound healing, skin, VEGFa.

References:

1. Khosrotehrani, K., Johnson, K. L., Cha, D. H., Salomon, R. N., and Bianchi, D. W. (2004) Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *Jama* 292, 75-80
2. Nguyen Huu, S., Oster, M., Uzan, S., Chareyre, F., Aractingi, S., and Khosrotehrani, K. (2007) Maternal neoangiogenesis during pregnancy partly derives from fetal endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1871-1876
3. Nguyen Huu, S., Oster, M., Avril, M. F., Boitier, F., Mortier, L., Richard, M. A., Kerob, D., Maubec, E., Souteyrand, P., Moguelet, P., Khosrotehrani, K., and Aractingi, S. (2009) Fetal microchimeric cells participate in tumour angiogenesis in melanomas occurring during pregnancy. *Am J Pathol* 174, 630-637
4. Fathke, C., Wilson, L., Hutter, J., Kapoor, V., Smith, A., Hocking, A., and Isik, F. (2004) Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 22, 812-822
5. Tepper, O. M., Carr, J., Allen, R. J., Jr., Chang, C. C., Lin, C. D., Tanaka, R., Gupta, S. M., Levine, J. P., Saadeh, P. B., and Warren, S. M. (2010) Decreased circulating progenitor cell number and failed mechanisms of stromal cell-derived factor-1alpha mediated bone marrow mobilization impair diabetic tissue repair. *Diabetes* 59, 1974-1983
6. Awad, O., Jiao, C., Ma, N., Dunnwald, M., and Schatteman, G. C. (2005) Obese diabetic mouse environment differentially affects primitive and monocytic endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 23, 575-583
7. Pitchford, S. C., Furze, R. C., Jones, C. P., Wengner, A. M., and Rankin, S. M. (2009) Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell* 4, 62-72
8. Schmeisser, A., Garlich, C. D., Zhang, H., Eskafi, S., Graffy, C., Ludwig, J., Strasser, R. H., and Daniel, W. G. (2001) Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 49, 671-680
9. Hristov, M., Schmitz, S., Schuhmann, C., Leyendecker, T., von Hundelshausen, P., Krotz, F., Sohn, H. Y., Nauwelaers, F. A., and Weber, C. (2009) An optimized flow cytometry protocol for analysis of angiogenic monocytes and endothelial progenitor cells in peripheral blood. *Cytometry A* 75, 848-853
10. Hirschi, K. K., Ingram, D. A., and Yoder, M. C. (2008) Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1584-1595
11. Hildbrand, P., Cirulli, V., Prinsen, R. C., Smith, K. A., Torbett, B. E., Salomon, D. R., and Crisa, L. (2004) The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood* 104, 2010-2019
1. Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J. M. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228.



I-4. DETECTION PAR MULTI-MARQUAGES DES PLASMOCYTES TUMORAUX RESISTANTS APRES HAUTE DOSE DE MELPHALAN : MISE EN EVIDENCE D'UNE FENETRE THERAPEUTIQUE OPTIMALE

Laure Vincent

Pré-requis et objectifs :

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne incurable. A travers cette étude, nous avons souhaité caractériser les cellules malignes résistantes aux traitements actuels ainsi que leur micro environnement cellulaire et moléculaire. Le but est de mettre en évidence des interactions qui puissent devenir des cibles thérapeutiques ainsi que des fenêtres optimales de traitement.

Méthodes :

Nous avons suivi 24 patients atteints de MM nouvellement diagnostiqués et traités par une induction basée sur le bortezomib et la dexaméthasone, suivi d'une intensification par haute dose de Melphalan (HDM), un alkylant. Les plasmocytes tumoraux (PC-T) et normaux (PC-N) ont été détectés et dénombrés à l'aide d'une technique de cytométrie en flux multiparamétrique 7/8 couleurs à la fin de l'induction, 9 jours et 3 mois après HDM. Une sensibilité de détection de 10^{-5} a été atteinte pour les PC-T. Le contenu cellulaire du produit de cytophérèse réinjecté au patient a lui aussi été analysé. Les plasmocytes étaient caractérisés en termes de marqueurs tumoraux (CD200, CD56, CD117, CD27, CD20, CD19, CD45), statut de prolifération (Ki67) et expression du récepteur CCR2. A l'aide d'une technique de multiplex (technologie Luminex®), nous avons évalué parallèlement l'environnement cytokinique et chémokinique médullaire (IL-1 α , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, EGF, eotaxine, FGF-b, GM-CSF, G-CSF, HGF, IFN- γ , IFN- α , IP-10, CXCL10, MCP-1, CCL2, MIG, RANTES, TNF- α et VEGF) à la fin de l'induction, 9 jours et 3 mois après HDM. IGF1, IL21, BAFF et APRIL ont été dosés par ELISA.

Résultats :

Nous avons pu montrer que 2/3 des patients présentaient des PC-T détectables après l'induction. A 9 jours post HDM, dans un contexte d'aplasie médullaire (numération médiane de 0.4 (0.1-3.6) cellules nucléées totales / mL), nous avons observé un fort enrichissement en plasmocytes tumoraux (numération médiane 5.9 (0.1-76.9) / mm³) et normaux (numération médiane 3.3 (0.4-32.2) / mm³). A ce point d'évaluation, l'environnement cytokinique / chémokinique présent dans la moelle osseuse était particulièrement favorable à la survie, à la croissance et au homing des PC tumoraux. De manière intéressante, nous avons montré que la chémokine CCL2 (chemokine C-C motif ligand 2) est la seule cytokine / chémokine exprimée de manière différentielle entre patients en réponse complète cytométrique après induction et patients avec PC-T persistants, avec un taux 2.1 fois plus élevé chez ces derniers. Or CCL2 est un facteur chémotactant et de survie des cellules myélomateuses. Parallèlement, des données préliminaires sur deux patients montrent un enrichissement à 9 jours post autogreffe, en PC-T positifs pour CCR2, le récepteur de CCL2. Cette interaction pourrait représenter une cible cliniquement significative pour éliminer la maladie résiduelle.

.../...



.../...

La numération des PC-N dans la moelle osseuse était réduite de 50% entre le diagnostic et la fin de l'induction et était redevenue quasiment normale 1 an après HDM. Le produit de leukaphérèse réinjecté aux patients contenait un fort taux de PC-N (valeur médiane de 0.8×10^6 PC-N / kg ($0.2-24.1 \times 10^6$), un chiffre équivalent à 25% du nombre de cellules souches hématopoïétiques CD34+ réinjectées. Il est intéressant de noter que 9 jours après HDM, la numération médiane des PC-N des patients en maladie résiduelle négative étaient 8 fois supérieure (25.6 versus 3.3 PC-N / mm^3) à celle des patients qui avaient des PC-T détectables persistants ($P = 0.02$) alors qu'aucune différence n'était détectée avant HDM. Une observation similaire était faite dans le sang périphérique avec des comptes 7 fois supérieurs (5.6 v 0.8 PC-N / mm^3) chez les patients en maladie résiduelle négative à 9 jours post HDM. Une explication pourrait venir de la réinjection de 6 fois plus de PC-N chez les patients MRD négatifs (3.0×10^6 versus 0.7×10^6 PC-N/ kg). Cette observation suggère l'existence de différences de microenvironnement médullaire et de capacités de mobilisation des PC-N entre patients répondeurs et patients résistants.

Conclusion :

En conclusion, nous montrons que la période suivant immédiatement l'intensification par HDM pourrait constituer une fenêtre thérapeutique optimale pour cibler les cellules tumorales résiduelles ainsi que leurs interactions avec leur micro- environnement de survie. L'interaction CCR2 / CCL2 pourrait être particulièrement intéressante, un anticorps anti CCR2 étant actuellement en développement clinique dans le contexte de polyarthrite rhumatoïde (Van Driel et al. 2008).

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP10-2 : IMMUNOLOGIE 2



I-1. NOUVELLES NOTIONS SUR LES CAUSES DE L'HYPERACTIVITÉ DU SYSTÈME IMMUNITAIRE DANS L'INFECTION PAR VIH-1 APPORTÉES PAR LA CYTOMÉTRIE EN FLUX 13 COULEURS

C.A. Dutertre, S. Amraoui, A.L. DeRosa*, J.P. Jourdain, L. Vimeux, M. Goguet, E. Oksenhendler, J.P. Viard, L. Garderet, N. Decroix, P. Loulergue, O. Launay, C. Goujard, C. Deveau, L. Meyer, A. Hosmalin.*

Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Paris, France, 75014.

L'infection par le VIH-1 s'accompagne d'une diminution de la numération des cellules dendritiques (DC) plasmacytoïdes [pDC, CD303(BDCA-2)⁺, produisant des IFN de type I] et des DC myéloïdes [mDC, CD11c⁺CD1c(BDCA-1)⁺, produisant de l'IL-12] circulantes. A présent la cytométrie de flux 13 couleurs nous a permis de déterminer le sort d'autres populations de DC et de monocytes lors de l'infection.

Nous avons étudié les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de 23 patients infectés par VIH-1 en phase chronique (8 traités par traitement antirétroviral et 15 non-traités) et de 13 témoins. Nous avons aussi étudié les cellules spléniques de 4 patients VIH-1+ et de 4 patients non-infectés, tous splénectomisés pour traiter des purpuras thrombopéniques idiopathiques ou lors de la résection d'une tumeur adhérente.

La cytométrie en flux 13 couleurs nous a permis de montrer que chez les patients VIH-1+ non-traités, le nombre et la fréquence des mDC CD141 (BDCA-3)⁺ circulantes sont fortement réduits dans le sang et la rate. Nous avons récemment caractérisé cette population comme homologue de celle des DC CD8 α ⁺ murines pour sa forte capacité à effectuer la présentation croisée. Au contraire, le nombre et la proportion d'une sous-population pro-inflammatoire des monocytes CD14⁺CD16⁺ sont préférentiellement augmentées dans le sang et la rate.

Des données fonctionnelles après stimulation in vitro indiquent que les monocytes pro-inflammatoires jouent probablement un rôle très important dans l'hyperactivation du système immunitaire qui est un élément de pathogénicité de l'infection par le VIH-1.



I-2. PREMATURE IMMUNE RISK PHENOTYPE IN SUBJECTS THYMECTOMIZED DURING EARLY CHILDHOOD

Delphine Sauce,^a Martin Larsen,^a Solène Fastenackels,^a Anne Duperrier,^b Michael Keller,^c Beatrix Grubeck-Loebenstein,^c Christophe Ferrand,^b Patrice Debré,^a Daniel Sidi^d and Victor Appay^a

^a Cellular Immunology laboratory, INSERM UMRS945, Avenir Group, Hôpital Pitié Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, 75013 Paris, France

^b INSERM U645, Etablissement Français du Sang Bourgogne/Franche-Comté, 25020 Besançon, France

^c Institute for Biomedical Aging Research, Austrian Academy of Sciences, A-6020 Innsbruck, Austria

^d Service de cardiologie pédiatrique, Hôpital Necker enfants malades, 75006 Paris, France

The thymus is the major production site of T cells, whose stocks are built up during fetal and early postnatal life. Its function diminishes from birth onwards, and although thymic output is maintained into adulthood, the thymus largely degenerates into fatty tissue in elderly adults. After the initial production of T cells during early life, its contribution to immune development remains a matter of debate. During cardiac surgery of congenital heart defects (CHD), the thymus is resected for better access to the heart in newborns. Here, we show that young adults thymectomized during early childhood (YATEC) have marked immunological alterations. The absolute CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte counts are decreased; in addition these populations are characterized by a loss of naïve cells and an amplification of oligoclonal memory subsets. This shift in the composition of the T cell compartment (from naïve cells to a predominance of memory T cells) ultimately leads to scarcity of immune resources since such patients cannot refurnish naïve T cells. This “lymphopenic environment” results in homeostatic T-cell proliferation that is associated with higher plasma level of IL-7.

Moreover, despite a young age, a subgroup of patients present a particularly altered phenotype, distinctive of the immune risk phenotype (IRP), which defines a cluster of immunological markers associated with increased mortality in the elderly. Interestingly, this is directly related to infection by cytomegalovirus (CMV) and the development of strong T cell responses, which may exhaust the naïve pool in absence of adequate T cell renewal.

Our data proves that a chronic infection such as CMV, independently of age, results in profound and persistent impairments of the immune system by potentially mobilizing further resources and highlights the importance of preserving the thymus during CHD surgery.



II-1. LA PROGRESSION VERS LE STADE SIDA EST ASSOCIÉE À L'ÉMERGENCE DE CELLULES iNKT PRODUCTRICES D'IL-17, DÈS LA PHASE PRÉCOCE DE L'INFECTION PAR LE VIS.

Campillo-Gimenez LI, Cumont MC,

Fay M, Kared H, Monceaux V, Diop O, Müller-Trutwin M, Hurtrel B, Levy Y, Zaunders J, Dy M, Leite de Moraes M, Elbim C1 and Estaquier J2.

(1) UMRS 945, Hôpital la Pitié Salpêtrière, Paris, France. (2) U955, IMRB, Faculté de médecine, Créteil, France.

L'IL-17 est une cytokine impliquée dans les réponses inflammatoires et les défenses antimicrobiennes. Par des études immuno-histochimiques, nous avons observé une augmentation du nombre de cellules productrices d'IL-17 au niveau des ganglions axillaires et mésentériques de singes rhésus macaques (RM) suite à l'infection pathogène par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS). Cette population apparaît dès la phase de primo-infection, avec un pic à J14 post-infection, concomitant à une augmentation de l'expression du TGF- β et de l'IL-18 au sein de ces organes. Par la technique « CBA », aucune autre cytokine inflammatoire n'est mesurée (IL-6, IL-8 ou encore TNF- α). Par cytométrie en flux, nous avons alors caractérisé cette population cellulaire comme étant des cellules iNKT productrices d'IL-17. Cette sous population émerge dans les ganglions ainsi que dans le sang périphérique et persiste au cours de la phase chronique, et ce d'autant plus chez les singes non contrôleurs, c'est-à-dire progressant rapidement vers un SIDA, comparé aux singes contrôleurs. Au contraire, chez les singes dits non pathogènes, aucune augmentation du nombre de cellules exprimant l'IL-17, le TGF- β ou l'IL-18 n'est observée. En parallèle, nous avons démontré que le TGF- β et l'IL-18 induisent, *in vitro*, l'expansion des cellules iNKT productrices d'IL-17.

L'ensemble de ces résultats ont donc permis de mettre en exergue, pour la première fois, l'émergence de cellules iNKT IL-17+ associée à la pathogénèse de l'infection par le VIS et suggère le rôle important du TGF- β et de l'IL-18 dans leur développement.



II-2. EFFET DES IMMUNOGLOBULINES INTRA VEINEUSES SUR LES FONCTIONS DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

Sarah Casulli, Selma Topçu, Lakhdar Fattoum, Stephan von Gunten, Hans-Uwe Simon, Jean-Luc Teillaud, Jagadeesh Bayry, Srinivasa V. Kaveri and Carole Elbim

INSERM UMRS U945 "Immunité et Infection", Hôpital Pitié Salpêtrière

Les Polynucléaires Neutrophiles (PMN) humains constituent un des pivots de l'immunité innée, jouant un rôle majeur dans l'élimination des agents pathogènes. Néanmoins, stimulés de façon inappropriée ou excessive, ils peuvent être à l'origine des lésions tissulaires graves, ce qui souligne l'importance d'une régulation fine et précise de leurs fonctions. Les immunoglobulines intraveineuses (IVIg), préparations thérapeutiques d'immunoglobulines purifiées à partir de pools de plusieurs milliers de donneurs sains, pourraient intervenir dans cette régulation. Utilisées initialement pour le traitement des déficits immunitaires, les IVIg ont récemment vu leur utilité en tant qu'agent immunorégulateur dans le traitement de pathologies auto-immunes et inflammatoires systémiques au cours desquelles les PN jouent un rôle majeur.

Nous avons utilisé la technique de cytométrie de flux pour examiner *in vitro* les effets des IVIg sur les principales étapes fonctionnelles des PMN, à savoir l'expression des molécules d'adhérence et l'explosion oxydative ainsi que sur l'apoptose des PN, dans des conditions de sang total, permettant ainsi de se rapprocher des conditions physiologiques et d'éviter tout artefact de stimulation lié aux procédures d'isolement.

Nos résultats montrent un effet différentiel des IVIg sur les PMN en fonction de la dose utilisée. Tout d'abord, les IVIg utilisées *in vitro* à faibles doses induisent l'activation des PMN, reflétée par une diminution de l'expression du CD62L et une augmentation de l'expression du CD11b à la surface des PMN, une augmentation de l'explosion oxydative et une survie prolongée. Cet effet pourrait expliquer, au moins en partie, l'action bénéfique des IVIg à faibles doses au cours du traitement de certains déficits immunitaires. A l'opposé, les IVIg utilisées à fortes concentrations inhibent l'effet exercé par le LPS, puissant médiateur inflammatoire, sur la dégranulation, l'explosion oxydative et la survie des PMN. Cet effet inhibiteur interviendrait, au moins en partie, dans l'action anti-inflammatoire observée lors d'un traitement par de fortes doses d'IVIg dans différentes pathologies auto-immunes et inflammatoires systémiques.



II-3. LES INHIBITEURS DE mTOR, APRÈS TRANSPLANTATION HÉPATIQUE, INDUISENT UNE AUGMENTATION DES CELLULES T RÉGULATRICES, EN PRÉSERVANT LEUR FONCTION SUPPRESSIVE

Khaldoun Ghazaï⁽¹⁾, Fabien Stenard⁽¹⁾, Samia BenOthman⁽¹⁾, Lynda Aoudjehane⁽¹⁾, Yvon Calmus^(1,2), Filomena Conti^(1,2).

(1) UPMC Univ Paris 06 & INSERM, UMR_S 938, CdR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France, (2) AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Pôle Digestif, Centre de Transplantation Hépatique, F-75012, Paris, France

Les inhibiteurs de mTor peuvent être utilisés après transplantation d'organe en prophylaxie du rejet aigu. Des études ont montré que les Treg jouent un rôle dans les mécanismes de tolérance immunitaire. Chez l'homme, les inhibiteurs de mTor, contrairement aux inhibiteurs de la calcineurine (ICN), semblent préserver les Treg.

Le but de notre étude a été d'évaluer le nombre et la fonction des Treg chez des transplantés hépatiques avant et après conversion d'un ICN à un traitement par inhibiteur de mTor.

Cinq patients transplantés hépatiques, avec une fonction hépatique stable, ont été convertis pour raison carcinologique (4 carcinomes hépatocellulaires et un cholangiocarcinome), d'un ICN à un inhibiteur de mTor, qui était introduit à 2mg/jour (taux sanguin: 7 à 10 ng/ml) et les ICN diminués de 50% jusqu'à l'interruption totale. Tous les patients, excepté un, sont restés sous mycophenolate mofetil. Des échantillons sanguins ont été collectés de façon prospective à J0, tous les 15 jours puis tous les mois après conversion. Nous avons évalué, par cytométrie en flux, les Treg (CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺ et CD127⁻) sur les cellules mononuclées du sang et, après isolement des Treg sur colonnes magnétiques, nous avons réalisé des tests fonctionnels afin d'évaluer l'habilité des Treg à supprimer l'activité des cellules T CD4.

Le traitement par inhibiteur de mTor a été bien toléré, nous n'avons observé aucun rejet aigu et la fonction du greffon est restée stable pendant la durée de l'étude pour tous les patients. Trente deux échantillons ont été analysés, Le nombre moyen d'échantillons sanguins était de 6 ± 2 (4 à 11) par patient. Tous les patients ont présenté une augmentation significative et prolongée des Treg après conversion (moyenne de Treg = $7,5 \pm 0,78$ % des cellules T CD4, augmentation moyenne de $2,1 \pm 0,36$ %, par rapport au taux de base à J0 sous ICN ($3,8 \pm 1,05$ % des cellules T CD4, $p=0,003$). A chaque prélèvement, les Treg ont préservé leurs capacités fonctionnelles à supprimer les cellules T CD4⁺ activées.

Nos résultats suggèrent que l'introduction des inhibiteurs de mTor dans le traitement immunosuppresseur des patients transplantés hépatiques induit une augmentation significative et prolongée des Treg CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺, tout en maintenant leurs capacités fonctionnelles.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP12 : IMAGERIE MÉDICALE



I-1. EARLY DETECTION OF RESISTANCE TO ANTITUMORAL DRUGS BY FLUORESCENCE IMAGING

A. Deniset-Besseau¹, F. Miannay^{1,2}, C. Laplace-Builhé³, P. Vielh⁴, S. Lécart², B. A. Lwaleed⁵, P. Eschwege⁶, M-P Fontaine-Aupart^{1,2}

⁽¹⁾ Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, Université Paris-Sud, Orsay; ⁽²⁾ Centre de Photonique Biomédicale, Université Paris-Sud, Orsay; ⁽³⁾ Imaging and cytometry platform, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif; ⁽⁴⁾ Department of Biopathology and Translational Research Laboratory, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif; ⁽⁵⁾ Department of Urology, Southampton University Hospitals NHS Trust, Southampton; ⁽⁶⁾ Service d'Urologie, CHU Brabois, Vandoeuvre-Lès-Nancy and Antony Private hospital. (marie-pierre;fontaine-aupart@u-psud.fr)

Drug resistance limits effectiveness in treating malignancy with chemotherapy by modifying internalization and/or externalization of the drugs through the cancerous cell membranes.

In this context, doxorubicin is a molecule of interest, both for its well-known primary or acquired resistance during patient treatment and for its fluorescence properties. Indeed, 30-40% of patients treated with either doxorubicin for breast cancer or with a regimen combining methotrexate, vinblastine and cisplatin (named MVAC) for urothelial carcinomas, are resistant to treatment.

We have developed a promising *ex vivo* assay to evaluate patients' response to chemotherapy based on a screening method adapted to cells on smears taking advantage of the fluorescence properties of some drugs widely used in oncology. The assay was first optimized on a panel of breast or urothelial cell lines, respectively, and extended to breast fine needle aspirations and urinary samples of patients. Originally set up on a confocal microscope, this assay has been proved to be effective using a standard epifluorescence microscope.

The drug fluorescence behaviour observed on smears from clinical specimens is identical to that obtained from cell cultures. The fluorescence of sensitive cells to the chemotherapy is mainly localized in the nucleus, whereas resistant cells show a weak fluorescence signal localized in the cytoplasm. The difference in terms of fluorescence intensity is also highlighted through fluorescence spectra, allowing us to propose a specific fluorescence signature for the identification of chemotherapy resistant cells.

Taking together the results indicate that the assay seems to be promising in evaluating the response of patient's tumours to doxorubicin or MVAC therapy and may constitute a reliable, not constraining and inexpensive assay, to diagnose resistance to oncological drugs. Such standardized technique could then be ideally included in a general therapeutic strategy and could contribute to the development of personalized medicine.



I-2. IMAGERIE CLINIQUE A L'ECHELLE CELLULAIRE : LE DEFI DE L'ENDOMICROSCOPIE CONFOCALE IN VIVO POUR LA CANCEROLOGIE

M.Abbaci⁽¹⁾, O.Casiraghi⁽²⁾, S.Temam⁽³⁾, J.Bosq⁽²⁾, M.Ferchiou⁽²⁾, C.Laplace-Builhé⁽¹⁾

⁽¹⁾ Plate-forme Imagerie et Cytométrie. IR4M CNRS UMR 8081, IRCIV, Institut Gustave Roussy ; ⁽²⁾ Département de Pathologie, Institut Gustave Roussy ; ⁽³⁾ Département de Cancérologie Cervico-faciale, Institut Gustave Roussy, Villejuif ; (muriel.abbaci@igr.fr)

L'intérêt de la microscopie confocale pour la recherche fondamentale est aujourd'hui largement établi. Des avancées technologiques majeures en optique ont été accomplies ces dernières années, permettant d'explorer *in vivo* des lésions tissulaires à l'échelle microscopique au chevet du malade. Cette nouvelle technique d'imagerie appelée Endomicroscopie Confocale (EMC) a pour but d'obtenir en temps réel des informations à l'échelle cellulaire, s'affranchissant ainsi des prélèvements de tissu puis de la préparation des lames d'histologie correspondantes dans le laboratoire d'anatomo-pathologie. Les applications potentielles de l'EMC comprennent le diagnostic des pathologies, le guidage des biopsies, et le suivi de l'efficacité des traitements. Des systèmes commerciaux sont proposés en clinique pour l'exploration de la peau et des yeux mais aussi des organes creux à l'aide de sondes optiques fibrées dont le diamètre est millimétrique. Les images sont produites, soit à partir de la lumière réfléchiée en mode réflectance, soit par émission de fluorescence. Le nombre grandissant d'études cliniques internationales publiées (80 répertoriées en 2011) reflète l'essor de cette technologie et plus particulièrement en mode fluorescence pour l'imagerie clinique oncologique des appareils digestif, urinaire et respiratoire.

L'EMC n'a pourtant jamais été évaluée en cancérologie Oto-Rhino-Laryngée (ORL) où elle pourrait contribuer significativement au diagnostic des lésions cancéreuses et à la délimitation des marges de résection tumorale. Une étude préclinique de corrélation histo-morphologique entre les images réalisées par EMC et l'histologie de référence sur pièces opératoires ORL a été menée à l'Institut Gustave Roussy de Villejuif. Deux marqueurs fluorescents, l'acriflavine hydrochloride et la fluorescéine sodique, ont été utilisés pour améliorer le contraste d'image de 47 échantillons provenant de 29 patients. 140 images produites par EMC (3 sites/échantillon) et 47 préparations histologiques standards des mêmes échantillons ont été présentées de manière dissociée et aléatoire à trois pathologistes spécialisés dans le domaine ORL. Les résultats ont montré un excellent score diagnostique avec l'EMC pour la discrimination entre des images de sites sains et pathologiques et ce, que la lecture ait été effectuée par un pathologiste formé ou non à la lecture des images par EMC (sensibilité de 90 à 97% et spécificité de 84,6 à 97,4%, selon le pathologiste).

Au-delà de notre étude, nous avons observé que la place réservée au pathologiste pour l'interprétation des images par EMC en pratique clinique est étonnamment limitée. Les études cliniques, rapportées majoritairement des Etats-Unis et d'Allemagne, mettent en avant le rôle du chirurgien pour la sélection de la zone à analyser, l'acquisition des images, mais également pour leur interprétation. Il n'est pas actuellement possible en France, qu'un diagnostic basé sur l'histologie d'un tissu avec prise de décision thérapeutique immédiate ne soit pas porté par un pathologiste. Une question majeure se pose alors : comment intégrer le pathologiste dans le processus d'analyse en temps réel par EMC pour garantir un avenir en routine clinique à cette technologie?

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP13 :

MICROBIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE



I-1. APPORT DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX POUR LE SUIVI DE L'ÉTAT MÉTABOLIQUE DES POPULATIONS BACTÉRIENNES AU SEIN D'UNE MATRICE COMPLEXE : APPLICATION AUX BOUES ACTIVÉES

Prorot⁽¹⁾, C. Dagot⁽¹⁾ et P. Leprat⁽¹⁾

⁽¹⁾ Groupement de Recherche Eau Sol et Environnement (GRESE), Université de Limoges, France ; (prorot@ensil.unilim.fr).

L'utilisation de sondes fluorescentes employées en combinaison avec des techniques de comptage appropriées, en particulier la cytométrie en flux, permet aujourd'hui une meilleure compréhension des activités métaboliques impliquées dans divers processus biologiques. A la différence des méthodes fondées sur une estimation globale de la biomasse, couramment utilisées dans le domaine du traitement des eaux usées, l'utilisation de sondes fluorescentes permet une analyse potentiellement multiparamétrique à l'échelle cellulaire.

L'amélioration constante de la sensibilité de mesure, de la puissance des lasers, de l'écoulement du flux des cytomètres permet aujourd'hui de détecter des éléments relativement petit tels que les bactéries et surtout de les différencier de la matière organique inerte. La cytométrie en flux devient donc aujourd'hui un outil analytique tout à fait pertinent en microbiologie environnementale. Toutefois, en raison de la présence de cellules agrégées en microflocs, l'étude par CMF de la flore microbienne de certaines matrices environnementales complexes, telles que les boues activées, nécessite une préparation préalable des échantillons qui consiste à désagréger au maximum les microflocs et ainsi permettre une analyse individuelle des cellules. Un état des lieux de ces différentes méthodes sera donc présenté dans une seconde partie.

De nombreux fluorochromes permettant d'accéder aux différents états physiologiques des microorganismes sont décrits dans la littérature ; ils conduisent à la détection de paramètres structuraux et/ou fonctionnels. Grâce au développement de ces outils analytiques, il est désormais possible de suivre, en temps réel, l'évolution physiologique d'une population bactérienne. Le suivi de paramètres tels que le potentiel de membrane, l'activité respiratoire ou les activités estérases, inabordable par les techniques de microbiologie classique ou moléculaires, présente donc un intérêt majeur dans les domaines des bioprocédés et particulièrement pour le contrôle des processus d'épuration. Ainsi, il existe une grande diversité de fluorochromes disponibles rendant le choix parfois difficile pour l'utilisateur. Dans le domaine environnemental, ce choix devra tenir compte non seulement du/des paramètre(s) d'intérêt (structuraux ou fonctionnels) mais également des propriétés intrinsèques des fluorochromes (spectre d'absorption et d'émission, rendement quantique, coefficient d'absorption...).

Enfin, l'application de cette méthodologie au suivi des populations microbiennes au cours de traitements d'hydrolyse visant à réduire la production de boues lors de l'épuration des eaux usées sera présentée dans une dernière partie.



I-2. APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY FOR THE RAPID QUANTIFICATION OF VIABLE BACTERIA AND BIOMASS IN WASTEWATER AND ACTIVATED SLUDGE

S. Tamburini⁽¹⁾, P. Foladori⁽¹⁾, L. Bruni⁽²⁾

(1) Department of Civil and Environmental Engineering, University of Trento, via Mesiano, 77, 38050 Trento, Italy. (2) Chemical and Biological Laboratories, ADEP, Agenzia per la depurazione (Wastewater Treatment Agency), Autonomous Province of Trento, via Lung'Adige Braille, Trento, Italy. tamburini@science.unitn.it

Conventional cultivation methods using selective media have been widely used, but it is well known that they underestimate the microbial population in wastewater and activated sludge, because only a small amount of cells (about 1-15%) are able to grow in nutrient media. In fact, most bacteria in activated sludge are in a physiological state known as "*viable-but-not-culturable*".

Flow cytometry (FCM), able to count more than 1000 cells per second, is a powerful multi-parametric and single-cell analysis, able to give a very precise quantification of free cells in a suspension after their staining with fluorescent probes.

Bacteria in environmental matrices, such as sewage wastewater or activate sludge, do not live as free cells, but form floc aggregates of different sizes ranging from 10 to several hundred micrometers made up microorganisms, colloids, organic polymers and cations. For the quantification of the bacterial cells with FCM it is necessary to operate a pre-treatment of the samples, to obtain the disaggregation of the flocs. An optimized pre-treatment of sonication (at specific energy of 80 kJ/L) permits to disaggregate the flocs into single free cells, reaching a maximum number of free cells without significant loss in cell viability.

The fluorescent staining of bacterial cells is based on the use of SYBR-Green I and Propidium Iodide: this double staining permits to distinguish intact and permeabilised bacterial cells from debris. SYBR-Green I is capable of staining all cells, whereas the polarity of Propidium Iodide allows it to penetrate only cells with permeabilised membranes. As a consequence, intact bacteria emit green fluorescence (and can be considered as viable cells), while permeabilised bacteria emit red fluorescence (and can be considered as dead cells).

With regards to particles with size in the typical range of bacteria, the Forward Angle Light Scattering (FALS) intensity acquired by FCM is affected mainly by volume and refractive index of bacterial cells and is approximately independent of the shape of the cells. The conversion from FALS intensity into bacterial biovolume is based on a calibration curve determined by using silica microspheres having relative refractive index as far as possible similar to that of bacteria. This knowing the bacterial biovolume we take into account the typical carbon content of the cells to obtain finally the viable bacterial biomass expressed as dry weight (or Volatile Suspended Solids, a common parameter used in wastewater treatment plants).

This rapid multi-step procedure based on FCM, potentially amenable to automation, was proposed for quantifying viable bacterial cells and viable bacterial biomass within the main stages of a wastewater treatment plant: raw and settled wastewater, activated sludge and effluents. With a such rapid procedure (a few minutes) dozens of samples can be processes per day. The applied FCM approach provides a useful tool for understanding the bacteria dynamics of activated sludge and may help to obtain additional information on biological processes in wastewater treatment.



I-3. ASSESSMENT OF BACTERIA IN WASTEWATER TREATMENT PLANTS USING FLOW CYTOMETRY AND FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION.

Stefano Papa

Facolta' di Scienze e Tecnologie, Universita' degli Studi "Carlo Bo", Campus Scientifico, Localita' Crocicchia, Urbino, Italy

The activated sludge process is the most used biological method in wastewater treatment and has a significant ecological and economic effect. This process is performed by a variable and mixed community of microorganisms, in which bacteria prevail and are the main microorganisms responsible for the degradation process in a plant. At the end of an activated sludge process, disinfection treatments are planned, the most common of which are a chlorination process and a UV exposure. The disinfection process global efficiency varies according to the type of pathogen (bacteria, virus, and parasites).

Microbiology water-quality control is based on the conventional culture methods; the response is time-consuming, and only culturable bacteria adapted to such growing conditions are counted.

Moreover, these methods severely underestimate the actual counts of viable cells present in the environmental water. So, the use of nonculturable techniques, such as flow cytometry and fluorescence *in situ* hybridization could improve the efficiency of a wastewater treatment plant and the quality control, especially in the effluents before the receiving ecosystem. In our study different experiments were conducted in order to compare flow cytometric count and traditional plate count, to evaluate the efficiency of chlorination in the downfall of bacterial charge. The application of CARD-FISH enhance the knowledge of the community structure and it can be useful to determine other potential pathogens present in the effluents.

Finally, the combination of cytometric rapidity and multi-parametric accuracy with the phylogenetic specificity of oligonucleotide FISH probes has been regarded as a powerful and emerging tool in aquatic microbiology.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP14 : SESSION PLATEFORMES



I-1. LE REFERENTIEL ISO 9001 APPLIQUE AUX ACTIVITES DE RECHERCHE ET DE PLATEFORME TECHNOLOGIQUE

Jennifer Jund-Riegert

Résumé non parvenu



I-2. STANDARD SAFETY PRACTICES FOR SORTING OF UNFIXING CELLS

Fabrice Maréchal

Service Prévention et Sécurité, Laboratoire Généthon, Evry

La prévention des risques biologiques est une question majeure dans nos laboratoires. Elle est essentielle lorsqu'il s'agit du tri de cellules non fixées.

En 1994, l'ISAC (International Society of Analytical Cytology) reconnaissant la nécessité de réaliser un guide des bonnes pratiques de sécurité dans ce domaine a rédigé et publié des directives en 1997. Depuis, de nombreux changements ont nécessité l'évolution de ces directives.

La méthodologie de base applicable passe par une bonne connaissance du risque apporté par les agents biologiques manipulés. La première étape des bonnes pratiques de sécurité consiste donc à réaliser une évaluation de ce risque en prenant en compte la connaissance des agents biologiques, de l'équipement utilisé, des locaux et de la probabilité de dissémination des produits. Le risque étant ainsi évalué, il sera possible de déterminer le confinement et les procédures les plus appropriées pour la manipulation. Chaque cas, chaque laboratoire, est unique et cette évaluation doit se faire pour chaque situation de travail.

Dans le cadre du confinement, depuis une dizaine d'années, des équipements de protection sont apparus sur les trieurs (et analyseurs). Étant donné le risque pour les opérateurs, ces appareils de contrôle de la dissémination des aérosols doivent être contrôlés par des méthodes appropriées.

Bibliographie

Standard Safety Practices for Sorting of Unfixed Cells, by Ingrid Schmid, Claude Lambert, David Ambrozak, and Stephen P. Perfetto, 2007

CYTO 2010 Special Workshop on Biosafety, by Stephen P. Perfetto and Kevin Holmes, 2010



I-3. METHODOLOGIE DE MESURE POUR LA VALIDATION DE SYSTEMES DE PROTECTION SUR LES CYTOMETRES

Dominique Bouilly

CETEP, Mainvilliers

Email: (cetep@wanadoo.fr)

Résumé :

La validation/qualification d'un cytomètre ne répond actuellement à aucune norme spécifique contrairement à d'autres équipements comme les Postes de Sécurité Microbiologique et les sorbonnes. Cette absence de référence peut poser problème car cela oblige à adapter le contrôle en fonction d'une part des spécificités de l'équipement concerné et d'autre part des attentes des utilisateurs. Ce dernier point est d'ailleurs crucial car le contrôle, pour être efficace et pertinent, doit répondre à des objectifs précis. Ces derniers peuvent être la recherche de la protection du produit, de l'opérateur, de l'environnement ou bien de l'ensemble.

Une fois les objectifs du contrôle connus, il s'agit alors pour la société en charge de la qualification de rédiger un protocole qui s'inspirera des normes y répondant. Celles-ci au final sont assez restreintes. Il s'agit principalement des normes issues des salles propres et environnements maîtrisés et notamment la norme NF EN ISO 14644-3 qui donne les méthodes d'essai. D'autres normes pourront être utilisées telle que la norme NF EN 12469 sur les critères de performance pour les Postes de Sécurité Microbiologique.



I-4. PROPOSITION D'UN GROUPE DE TRAVAIL POUR VERIFIER L'EFFICACITE DES SOLUTIONS INTERNES DE CAPTAGE A LA SOURCE SUR LES CYTOMETRES - TRIEURS

J. Simons ⁽¹⁾, C. Duperray ⁽²⁾

⁽¹⁾ Inserm, DRH/ Bureau de Coordination Prévention des Risques, ⁽²⁾ MRI-Cytométrie-IRB, Institut de Recherche en Biothérapies, Hôpital St Eloi, CHU de Montpellier

En cytométrie, comme pour toute autre activité professionnelle, le Code du Travail, dans son article L-233.5, fait obligation à l'employeur ou à son représentant de «mettre à disposition des salariés les moyens de protection **adaptés** au risque encouru». Cela signifie que seuls des moyens de protection qui ont fait preuve effective de leur efficacité peuvent être utilisés ou préconisés. Avec les cytomètres, c'est le cas pour la protection contre l'exposition accidentelle au rayonnement laser. Il en va tout autrement pour la protection contre l'exposition aux aérosols émis lors des opérations de tri. Les constructeurs proposent plusieurs solutions techniques de captage à la source des aérosols mais éprouvent beaucoup de difficultés à apporter les preuves expérimentales ou normatives de l'efficacité des procédés qu'ils promeuvent. Il est relativement aisé de demander aux constructeurs de prouver l'efficacité des matériels de captage (PSM, sorbonnes ou dérivés) qu'ils proposent en fournissant les résultats des tests d'efficacité, avec le cytomètre en place, selon les normes qui s'appliquent à ces matériels. Cela s'avère plus complexe pour les systèmes de captage à la source interne du fait de l'absence de tout texte normatif de référence. Toutefois, une méthode expérimentale de test existe. L'AFC et l'Inserm ont proposé, dans un premier temps, aux constructeurs de participer à une expérimentation ayant pour objectif de vérifier l'efficacité des solutions de captage à la source interne qu'ils développent. L'absence à ce jour de ces mesures ouvre la voie à des discussions sans fin et peut amener les utilisateurs à faire, en toute bonne foi, des choix de protection pouvant s'avérer non pertinents et les exposer à d'éventuelles poursuites en cas d'accident ou de contamination accidentelle. La réalisation de cette expérimentation, avec le concours volontaire des membres de l'AFC, permettra de s'assurer, sur un nombre varié de matériels, de l'efficacité réelle des procédés de captage à la source interne proposés par les constructeurs et de respecter les obligations du Code du Travail.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP15 : CELLULES SOUCHES



I-1. FLOW CYTOMETRY FOR BRAIN STEM CELLS IN ITS INFANCY: PITFALLS AND PROMISES

Marc-André Mouthon

Laboratoire de Radiopathologie, CEA, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, INSERM UMR967, 18 route du panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

Neural stem cells are cells that can self-renew and differentiate into the main types of brain cells. Neural stem cells are in relatively large amounts in many regions of the early embryonic nervous system and their proportion declines rapidly thereafter during development where they are diluted by the production of restricted progenitors and differentiated cells. In the adult brain, however, neural stem cells persist in restricted regions where they participate in brain plasticity and neuronal repair after injury. A number of studies have been reported on the purification of neural stem cells from mammals at different developmental stages and various brain regions, but their prospective isolation remain challenging. Design of methods to purify and analyse them is of most importance for clinical applications and basic research, as well. An overview of neural stem cells physiology and recent advances in their purification by flow cytometry will be discussed.



I-2. CELL SURFACE MARKERS IN THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CANCER STEM CELLS.

David C. Silvestre, PhD

Telomeres & Cancer lab, UMR3244. Institut Curie-Paris (david.silvestre@curie.fr)

There is now compelling evidence that some human solid tumors harbor a small population of cells, termed cancer stem cells (CSCs), characterized by their ability to undergo self-renewal and capacity to initiate tumorigenesis. One of the best-studied types of CSCs is that found in human gliomas, named glioma stem-like cells (GSCs). These GSCs have certain characteristics in common with normal neural stem cells, such as the capacity for self-renewal and long-term proliferation, the formation of neurospheres and the ability to differentiate into multiple nervous system lineages. However, they differ from normal neural stem cells in displaying the aberrant expression of differentiation markers, abnormal karyotypes and in generating tumors following their injection into immune-deficient mouse brain. GSCs are currently thought to be highly resistant to radiotherapy, surviving current treatments and in this way being responsible for glioma recidive. One cardinal feature in the study of these cells is the identification of putative molecular markers that would allow their isolation unequivocally for their study and the development of targeted therapies. In the case of GSCs, CD133 (Prominin) and CD15 (SSEA-1) have been proposed as bona fide GSCs markers. Simultaneously, some reports show that GSCs can be identified thanks to their side population profile. Both criteria (cell surface markers and side population activity) have been studied mainly through flow cytometry. We will discuss the most relevant current data on the field and the controversy existing on their real potential.



II-1. VIABILITY AND PROLIFERATION OF PREADIPOCYTES IN LAYER-SHAPED ALGINATE HYDROGELS

Bianca Galateanu(1), Sorina Dinescu(1), Valentina Mitran(1), Anisoara Cimpean(1) and Marieta Costache(1)

(1)Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bucharest, Romania (bianca.galateanu@gmail.com)

Traditional methods of cell manipulation on 2D surfaces have been proved insufficient for the new challenges in cell biology and biochemistry, especially in the field of tissue bioengineering. That is the reason why advances in materials chemistry, fabrication and processing technologies have led to design 3D cell culture matrices which better represent the geometry, chemistry, and signaling environment of natural extracellular matrix.

The aim of this study was to evaluate the viability of preadipocytes in thin layer alginate hydrogels and to investigate the morphology of the biohybrid construct. These experiments were conducted in the context of an increasing interest in adipose tissue regeneration using hydrogels based on natural compounds as 3D culture systems.

3T3-L1 preadipocytes used as model in this experiment were grown in DMEM medium supplemented with New Born Calf Serum at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. To achieve the 3D culture, trypsinized cells were centrifuged, counted and re-suspended into a 1.5% sodium alginate solution at a density of 7x10⁵ cells/ml. The cell suspension was placed into multi-well culture plates and incubated in standard conditions, in presence of calcium gluconate (CG hydrogel-CGH) and CaCl₂ solution (reference hydrogel-RH). In order to assess the proposed studies, 2-day and 7-day cultures were analysed. The set of experiments performed for each time point consisted of: i) evaluation of cell viability using spectrophotometric MTT assay; ii) visualization in confocal microscopy of the living cells (green fluorescence) and dead cells (red fluorescence) following staining with Invitrogen Live&Dead Kit; iii) assessment of the live/dead cells ratio by flow cytometry; iv) investigation of alginate cell entrapping scaffold morphology by scanning electron microscopy (SEM).

At 2-days post-seeding, CGH was populated with more viable cells than RH. This finding is supported by phase contrast observation of the cells incorporating formazan crystals. The confocal microscopy 3D images were obtained by laser scanning of the hydrogels. A higher cell density in the CGH compared to RH, at both 2 and 7 days post-seeding, was remarked. A very small population of double stained cells was also found. Flow cytometry results confirmed all the above data and additionally allowed the quantification of viable and double positive cells. At 7 days post-seeding, the amount of cells with altered plasma membrane decreased compared with 2 days of culture. SEM revealed a random structure for RH while CGH presented an uniform pattern. Cells embedded in both hydrogels showed a spherical shape, slightly elongated. Obvious differences at the cellular membrane level were noticed.

These preliminary experiments allowed us to validate a new recipe for preadipocyte embedding alginate hydrogel, which seems to be superior to classical one. Further, we intend to extend these studies on human adipose derived stem cells with the view of developing new strategies in soft tissue engineering.

These studies were supported by research project funds: CNCSIS-PCCE 248/2010

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des communications

SP16 : HEMATOLOGIE CLINIQUE



I-1. MYELOME MULTIPLE : LA MALADIE RESIDUELLE DANS LE PROTOCOLE IFM / DFCI 2009

N. Robillard⁽¹⁾, *M. Roussel*⁽²⁾, *S. Wuillemme*⁽¹⁾, *M. Attal*⁽²⁾, *H. Avet-loiseau*⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire d'Hématologie, Institut de biologie du CHU, Nantes ⁽²⁾Hématologie clinique, Hôpital Purpan, Toulouse

Le protocole IFM/DFCI s'adresse aux sujets jeunes atteints de myélome multiple (MM) au diagnostic et a pour but de comparer deux schémas de traitement par RVD (Lenalidomide + bortézomib+ dexaméthasone) de 1000 patients (700 en France + Belgique et 300 aux USA) . Après un traitement initial (1 cycle de 21 jours de RVD) les patients sont randomisés dans le bras A sans autogreffe ou B avec autogreffe.

BRAS A :

- RVD (2 et 3)(2 cycles de 21 jours)
- Collecte de cellules souches

- RVD (4, 5, 6, 7 et 8) (5 cycles de 21 jours)
- MRD1**
- Maintenance par lenalidomide (cycle de 28 jours sur 12 mois)
- MRD2**

BRAS B :

- RVD (2 et 3) (2 cycles de 21 jours)
- Collecte de cellules souches
- **Autogreffe**
- MRD1**
- RVD (4 et 5) (2 cycles de 21 jours)
- MRD2**

- Maintenance par Lenalidomide (cycle de 28 jours sur 12 mois)
- MRD3**

La maladie résiduelle (MRD) est évaluée sur la moelle osseuse (MO) des patients en TBRP (très bonne réponse partielle) par les techniques de cytométrie en flux (CMF) et de biologie moléculaire (BM) aux points indiqués ci -dessus.

Le recrutement des patients est multicentrique, la mesure de la MRD en CMF est réalisée en multicentrique (11 centres biologiques = 9français+1belge+1américain) et en BM elle est centralisée aux USA.

Plusieurs études ont montré l'intérêt pronostique de la MRD dans le suivi des patients atteints de MM, mais sur de trop petites cohortes(faible nombre de patients/sous groupes), en monocentrique, avec seulement 4 fluorescences et selon le phénotype plasmocytaire au diagnostic.

Dans le protocole IFM/DFCI 2009, la détection de la MRD en CMF est réalisée :

- indépendamment du phénotype des plasmocytes (PC) au diagnostic.
- en apportant la preuve de la clonalité des PCs tumoraux
- dans un seul tube de marquage (contenant 8 anticorps monoclonaux)
- sur 4 millions de cellules nucléées de la MO macro lysée.

La limite de détection est ainsi généralement > à $2.5 \cdot 10^{-5}$ (soit 50 / Nb de cellules nucléées analysées).

.../...



.../...

En CMF, l'étude de la MRD de façon multicentrique a donc imposé dans un premier temps une standardisation des réglages des cytomètres (utilisation des billes Rainbow), le respect de la technique de marquage, l'application d'une technique identique d'analyse des données et de calcul puis une mise en place de contrôles de qualité.

La faisabilité de ce protocole a été testée dans une étude pilote de phase II du protocole IFM 08 sur une cohorte de 30 patients traités selon le schéma du bras B du protocole IFM/DFCI 2009 avec une évaluation monocentrique de la MRD en CMF.



I-2. LYMPHOME SPLENIQUE DIFFUS DE LA PULPE ROUGE (SRPL) : UNE ENTITE CLINICO-PATHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DISTINCTE DU LYMPHOME SPLENIQUE DE LA ZONE MARGINALE.

L Baseggio^{1}, A Traverse-Glehen^{2*}, E Callet-Bauchu^{1*}, F Berger^{2*}, M FfrenchD^{1*}, Morel^{1*}, JP Magaud^{1*}, G Salles^{3*}, and P Felman^{1*}.*

Laboratoire d'Hématologie cellulaire ¹, Service d'Anatomie Pathologique ², Service d'Hématologie Clinique³, HCL/CHU Lyon Sud, France, *UMR CNRS 5239 Equipe «Pathologie des Cellules Lymphoïdes », Université Lyon 1, Lyon.

Le terme de **lymphome splénique diffus de la pulpe rouge (SRPL)**, correspond à une entité rare, dont la définition est avant tout sanguine reposant sur la présence au niveau du sang périphérique de lymphocytes villeux (LV) vrais à un taux significatif (> à 20% de la population lymphomateuse) et, d'une infiltration diffuse au niveau de la pulpe rouge. Cette entité présente des caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques, moléculaires et cliniques distinctes du lymphome de la zone marginale splénique (LZMS) classique (sans ou avec LV (SLVL)) et de la leucémie à tricholeucocytes (HCL). Elle est à rattacher à l'entité provisoire « splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma » décrite dans les lymphomes spléniques, inclassable de la classification OMS 2008.

Sur le plan clinique, les patients sont en moyenne plus âgés que dans le LZMS classique (97% de patients de plus de 60 ans contre 59%). Ils se présentent avec une splénomégalie sans adénopathies périphériques. Les cytopénies sont rares et sont souvent à rattacher à la splénomégalie. Une lymphocytose modérée peut être observée. La survie sans progression est significativement plus longue que dans le LZMS.

Les caractéristiques cellulaires du LV vrai dans le sang périphérique incluent un noyau rond à chromatine mottée et un cytoplasme basophile d'abondance variable le plus souvent moyenne, présentant des villosités franches réparties en un ou plusieurs pôles. Ces LV vrais se distinguent également des cellules décrites dans les formes variantes des HCL (HCL-v), par l'absence de nucléole proéminent.

Les cellules lymphomateuses sont habituellement CD5, CD23 et CD43 négative et diffèrent du LZMS classique par une expression significativement plus forte des CD11c, CD22 et CD76 et d'une absence d'expression des CD27, CD38 et CD24. Le CD103 est positif dans 20 à 30% des cas. Par ailleurs, l'absence d'expression des CD123, CD25 et de l'Annexine A1 le distingue de la leucémie à tricholeucocytes. Nous avons proposé un score fondé sur 5 de ces marqueurs membranaires (1 point si RFI du CD11c>25, 1 point si RFI du CD22 >130, 1 point si CD76 positif, 1 point si CD38 négatif, 1 point si CD27 négatif) qui permet de distinguer le SRPL (score ≥3) du LZMS (score <3).

Le caryotype ne met que rarement en évidence des anomalies chromosomiques (34%), ce qui est un autre élément qui le distingue du LZMS classique. Par contre les anomalies retrouvées sont celle observées dans les LZMS avec en particulier des délétions en 7q, des trisomies 18 et trisomie partielle en 3q.

Les gènes IGVH sont fréquemment mutés (79%) avec un biais d'utilisation des segments VH3-23 et VH4-34.

Au total, bien que le SRPL présente des caractéristiques morphologiques, immunologiques et moléculaires distinctes du LZMS et de la leucémie à tricholeucocytes, il existe néanmoins un important chevauchement entre ces différentes entités et en particulier avec la forme variante de la leucémie à tricholeucocytes (HCL-V).



I-3. LEUCEMIE A TRICHOLEUCOCYTES : LA MALADIE EN CMF A T-ELLE UN INTERET?

Francine Garnache Ottou

Résumé non parvenu



II-1. L'AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DE ZAP70 DANS LES LYMPHOCYTES T DE LLC EXPLIQUE POURQUOI LE RATIO T/B NE REFLETE PAS LE NIVEAU D'EXPRESSION DE ZAP70 DANS LES CELLULES B TUMORALES

D. Rizzo⁽¹⁾ ; G. Bouvier⁽²⁾ ; E. Guerin⁽¹⁾ ; F. Trimoerau⁽¹⁾ ; D. Bordessoule^(3,4) ; A. Jaccard^(3,4) ; J. Feuillard^(1,4)

⁽¹⁾ Laboratoire d'Hématologie, CHU Dupuytren, LIMOGES

⁽²⁾ Cellular Analysis Group, Beckman-Coulter, MARSEILLE

⁽³⁾ Service d'Hématologie et de Thérapie Cellulaire, CHU Dupuytren, LIMOGES

⁽⁴⁾ UMR CNRS 6101, Faculté de Médecine, LIMOGES

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif B fréquent, de pronostic variable. Le statut mutationnel de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgVH), considéré comme un « gold standard » des facteurs pronostics de la LLC, est corrélé à l'expression de la kinase ZAP70. En général, les patients atteints d'une LLC de bon pronostic ont un statut IgVH muté et ne surexpriment pas ZAP70. Les patients atteints de LLC de mauvais pronostic ont un statut IgVH non muté et surexpriment ZAP70. La cytométrie en flux représente la technique de choix pour dépister la surexpression de ZAP70 mais souffre d'un profond manque de standardisation en particulier concernant le mode d'expression des résultats.

Notre travail a consisté à comparer la méthode du ratio T/B publié dans un protocole de l'European Research Initiative on CLL (ERIC) au ratio calculé à partir d'un contrôle isoclonique sur 19 échantillons de LLC et 12 témoins sains. Le ratio T/B correspond au rapport entre la moyenne de fluorescence (MFI) des lymphocytes T résiduels et des lymphocytes B pathologiques. La méthode du contrôle isoclonique calcule le ratio entre la MFI des lymphocytes B pathologiques et la MFI de ces mêmes lymphocytes saturés par le même anticorps anti-ZAP70 non marqué.

Nos résultats montrent dans un premier temps que le niveau d'expression de ZAP70 par les lymphocytes T de patients atteints de LLC est significativement plus élevé que celui des lymphocytes T des témoins sains (valeurs de MFI : 20,7 et 10,6 respectivement, $p = 1,4 \cdot 10^{-5}$). Nous montrons ensuite que le ratio calculé à partir du contrôle isoclonique est significativement corrélé au niveau d'expression de ZAP70 dans les LLC de mauvais pronostic par rapport aux LLC de bon pronostic et aux lymphocytes B normaux (ratios calculés à 3,96 ; 1,96 et 1,16 respectivement avec $p = 3,6 \cdot 10^{-3}$ et $p = 4,9 \cdot 10^{-6}$ respectivement). Enfin, il apparaît que le ratio T/B ne correspond pas au niveau d'expression de la kinase ZAP70 dans les cellules B puisque nous retrouvons un ratio moyen égal à 7,78 pour les LLC non mutées de mauvais pronostic, 15,4 pour les LLC mutées de bon pronostic et 7,03 pour les lymphocytes B normaux.

En conclusion, le ratio T/B ne reflète pas le niveau d'expression de ZAP70 dans les LLC car basé sur un niveau d'expression dans les lymphocytes T. Or, nous montrons que les lymphocytes T de LLC surexpriment ZAP70 par rapport aux témoins sains. Le ratio calculé à partir du contrôle isoclonique semble donc plus juste. La signification biologique de la surexpression de ZAP70 par les lymphocytes T des patients atteints par une LLC n'est actuellement pas connue et pourrait correspondre à une réponse antitumorale ou à une stimulation par des cytokines sécrétées par les cellules de LLC ou leur microenvironnement.



II-2. EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE BCL2 ET DE BCL6 EN CYTOMETRIE EN FLUX DANS LES LYMPHOCYTES B CENTRO-GERMINAUX NORMAUX ET TUMORAUX

A. Debliquis¹, J. Meyer¹, E. Jean-Didier², S. Thiebault³, B. Drénou¹

⁽¹⁾ Laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalier de Mulhouse ⁽²⁾ Laboratoire de cytogénétique du Centre Hospitalier de Mulhouse ⁽³⁾ Service de pathologie du Centre Hospitalier de Mulhouse

Introduction :

Le lymphome folliculaire (LF) et une majorité des lymphomes diffus à grandes cellules (DLBCL) ont pour origine les cellules centro-germinales B (GC). Ces lymphomes présentent souvent des translocations récurrentes impliquant le gène *BCL2* qui code pour une protéine anti-apoptotique et/ou le gène *BCL6* qui code pour un répresseur de transcription. L'expression de ces protéines peut être analysée par la cytométrie en flux. Le but de ce travail est d'apprécier la signification de ces expressions.

Matériels et méthodes :

L'analyse a été effectuée sur une série d'amygdales et de ganglions réactionnels comme contrôle et sur 8 DLBCL et 29 LF dont 26 grade 1 (23 ganglions, 2 moelles, 1 rate), 2 grade 3A (1 ganglion, 1 sang) et 1 ganglion de grade 3B (WHO).

Les cellules GC sont déterminées soit par l'expression du CD10 et/ou par la faible expression du CD44 parmi les lymphocytes CD19+. L'expression intra-cytoplasmique de BCL2 et l'expression intra-nucléaire de BCL6 ont été analysées par cytométrie en flux (Canto II, BD Biosciences) après perméabilisation (intrastain, Dako). Les résultats sont exprimés par le rapport de la moyenne d'expression de BCL2 ou de BCL6 des cellules GC sur celle des lymphocytes T (BCL2-GC/T et BCL6-GC/T).

Résultats :

Pour BCL2 et BCL6, respectivement, la valeur seuil maximale de 0.69 (M=0.37+2 ET 0.16) et la valeur seuil minimale de 2.8 (M=3.8-2 ET 0.52) ont été établies dans les contrôles.

Dans les LF, 28/29 cas présentent un rapport BCL2-GC/T augmenté (4.6+/- 3.7) et 7/7 cas présentent un rapport BCL6-GC/T diminué (1.6+/-0.9). Tous ces LF présentent un réarrangement du gène *BCL2*, et le seul LF BCL2 négatif (rapport GC/T=0.54) présente un caryotype complexe incluant la t(14;18).

Dans les DLBCL, 8/8 cas présentent un rapport BCL2-GC/T augmenté (5.4+/-3.1).

Discussion :

L'hyperexpression de BCL2 peut être considérée comme un marqueur aberrant affirmant le caractère malin des cellules GC. L'absence d'hyper-expression ne peut cependant pas éliminer la malignité (1 cas négatif et les diagnostics de lymphome de Burkitt). La sous-expression de BCL6 dans les GC peut aussi être considérée comme un caractère de malignité et évocateur de LF.

Cette approche, capable par la multi-couleurs d'analyser BCL2 et BCL6 dans la sous-population GC peut donc être étendue dans des situations où l'histologie ne peut être effectuée (liquides, sang) ou lorsque la cytogénétique et la biologie moléculaire sont en défaut (points de cassure rares, circuit biologique). Ces données permettent d'envisager l'utilisation de ces anticorps en CMF pour la détection de la maladie résiduelle dans le LF et pour la caractérisation fine des DLBCL en parallèle des algorithmes histologiques.



II-3. INTÉGRATION DES INFORMATIONS PHÉNOTYPIQUES ET GÉNÉTIQUES DANS LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DU MYÉLOME.

S.Max, C.Herens, N.Schaaf-Lafontaine, A.Gothot.

UnilabLg, Faculté de médecine/CHU, Liège; (boursier du FRIA, stephmax26@gmail.com).

Le myélome multiple est une hémopathie maligne chronique d'évolution variable. La recherche de biomarqueurs améliorant la prise en charge des patients constitue un défi capital. Deux catégories de marqueurs sont utilisables : les anomalies chromosomiques et phénotypiques identifiées par FISH interphasique et par cytométrie en flux respectivement.

Nous avons comparé 4 kits d'enrichissement des cellules plasmocytaires de manière à augmenter la sensibilité des analyses FISH : le kit de sélection négative RosetteSep™ Human Multiple Cell Enrichment Cocktail de Stem Cell Technologies, l'EasySep™ Human Whole Blood CD138 Selection Kit (Stem Cell Technologies), l'EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit (Stem Cell Technologies) et la séparation MACS CD138 Human MicroBeads (Miltenyi Biotec).

	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS TESTÉS	TAUX D'ENRICHISSEMENT	PURETÉ MOYENNE (%)
RosetteSep™ Human Multiple Cell Enrichment Cocktail	9	2.2	43.5
EasySep™ Human Whole Blood CD138 Selection Kit	5	5.8	27.6
EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit	12	4.01	22.8
MACS CD138 Human MicroBeads	20	3.99	65

Le kit MACS offre le plus haut degré de pureté et nécessite moins de manipulations ce qui garantit la viabilité des plasmocytes pour les étapes d'analyses ultérieures.

.../...



.../...

Afin de déterminer l'utilité des sélections plasmocytaires, nous avons comparé les résultats FISH classiques (50 patients) avec ceux obtenus après enrichissement MACS (40 patients). Les anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic ont été recherchées : t(4,14), del(13q14) et del(17p13). En FISH classique, les informations obtenues sont peu contributives et ne sont détectées que dans 11% des cas. Lorsque les FISH sont réalisées post-enrichissement, on observe un plus grand nombre d'anomalies décelées (60% des cas).

Nous avons ensuite estimé et comparé les fréquences d'apparition des anomalies cytogénétiques sur 41 patients myélomateux.

Des t(4,14) sont mises en évidence dans 40% des cas alors que les del(13q14) et del(17p13) sont observées chez 15% et 7.5% des patients respectivement.

Les expressions antigéniques ont été analysées par une technique de marquage multiparamétrique CD38/CD138/CD45, CD38/CD45/CD19/CD56, CD38/CD138/CD28 et CD38/CD138/CD20/CD117. La répartition des anomalies phénotypiques est représentée ci-dessous :

	CD19-	CD56+	CD28+	CD20+	CD117+
Total des patients (41)	92.5 %	75 %	40 %	42.5 %	62.5 %
Patients présentant une t(4,14) (16)	100 %	87.5 %	31.2 %	43.7 %	62.5 %
Patients sans anomalies cytogénétiques (20)	80 %	65 %	45 %	45 %	55 %

L'absence d'expression du CD19 est majoritairement observée, les anomalies du CD56 et du CD117 sont également fréquents.

Sur cette série limitée de patients, on observe que les aberrations phénotypiques semblent indépendantes du statut cytogénétique des plasmocytes tumoraux analysés. Le profil d'expression antigénique est similaire en présence ou non d'une translocation.

Dans la suite des recherches, nous envisageons la réalisation de CGH-arrays sur plasmocytes sélectionnés permettant un screening de l'entièreté du génome des plasmocytes tumoraux. Les données cytogénétiques et phénotypiques seront comparées et confrontées aux différents stades de la maladie.

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Résumés des Posters



I. EXPRESSION DU LIGAND DE ILT-7 SUR LES CELLULES LYMPHOMATEUSES GANGLIONNAIRES : UN NOUVEAU MÉCANISME DE RÉGULATION NÉGATIVE DES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES ?

Vanessa Ratié¹, Fanny Angelot-Delettre¹, Bernadette Kantelip², Tony Petrella³, Franck Vitte², Eric Deconinck⁴, Philippe Saas¹, Francine Garnache Ottou¹,

¹INSERM U645, Besançon, France; ²Service d'anatomie et cytologie pathologique, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon, France, ³Service d'anatomie et cytologie pathologique, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Dijon, France; ⁴Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon, France.

Résumé

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont les principales cellules sécrétrices d'IFN- α de l'organisme, et par cette voie jouent un rôle clé dans l'immunité anti-tumorale¹. Il a été montré que des pDC aux fonctions altérées (diminution de leur activation et de leur capacité de sécrétion d'IFN- α) sont recrutées par certaines tumeurs². La molécule BST2 (*Bone Marrow Stromal Antigen 2*) a récemment été identifiée comme le ligand spécifique d'ILT-7 (*Immunoglobuline like transcript 7*), exprimé par les pDC³. L'interaction d'ILT7 avec son ligand induit une altération de la sécrétion d'IFN- α par les pDC, participant aux mécanismes d'échappement tumoral.

L'évaluation de l'expression de ce marqueur sur les cellules lymphomateuses ganglionnaires pourrait permettre d'identifier une nouvelle voie d'échappement des lymphomes non hodgkiniens (LNH), par inhibition fonctionnelle des pDC physiologiquement présentes dans le ganglion.

L'expression de BST2 a été évaluée, par cytométrie en flux, sur les cellules lymphomateuses de 68 ganglions atteints de différents types de LNH-B : Lymphome Diffus à grandes cellules B (LDGCB n=11), Lymphome Folliculaire (LF n=23), Lymphome Lymphocytaire (LL n=9) et Lymphome du Manteau (LM n=7). Nous avons analysé le nombre, le stade de maturation (CD80, CD83, CD86, HLA-DR), l'expression des molécules de homing (CD62L, CCR7) et d'ILT-7 par les pDC de ces mêmes ganglions, ainsi que leur capacité de sécrétion d'IFN- α et de cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-8) après activation en présence de GpGA et R848. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus sur les pDC présentes dans des ganglions réactionnels (n=18). L'étude est complétée par un marquage immuno-histochimique des pDC (CD123, CD303) sur coupe anatomopathologique, afin d'étudier leur localisation au sein de ces ganglions lymphomateux. Le nombre de pDC est diminué dans les ganglions lymphomateux par rapport aux ganglions réactionnels ([mediane ; SEM] : LDGCB [0,15 ; 0,13] ; LF [0,15 ; 0,05] ; LL [0,09 ; 0,04] ; LM [0,13 ; 0,06] ; Réactionnels [0,5 ; 0,16], p<0,05). Par contre, les pDC issues de ganglions lymphomateux ne présentent pas d'altération fonctionnelle (capacité de sécrétion d'IFN- α et de cytokines proinflammatoires conservée) ni de diminution de leur activation *in vitro* (expression des molécules de costimulation et de maturation), mais expriment plus faiblement CCR7 et CD62L (p<0,05). BST2 est exprimé par tous les types de cellules lymphomateuses, et surexprimé uniquement dans le cas des LDGCB par rapport aux lymphocytes B normaux résiduels des mêmes matériels ganglionnaires (p=0,06). Il n'existe pas de corrélation significative entre l'expression de BST2 sur les cellules lymphomateuses et la sécrétion d'IFN- α par les pDC (n=32). Nous n'observons pas, sur coupe anatomopathologique, de co-localisation entre les cellules lymphomateuses et les pDC, quelque soit le lymphome.

.../...



.../...

Au total, les pDC semblent maintenir leurs fonctions immunitaires dans cet environnement lymphomateux. Par contre, leur diminution dans les ganglions lymphomateux pourrait être liée à une altération de leur recrutement, *via* une diminution de l'expression des molécules de domiciliation. Le mécanisme et l'implication des cellules lymphomateuses dans l'altération du *homing* des pDC dans le ganglion restent à investiguer.

Références :

1. Schettini J, Mukherjee P. Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. Clin Dev Immunol. 2008; 2008:106321.
2. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. Cancer Res. 2003; 63:6478-6487.
3. Cao W, Bover L. Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. Immunol Rev. 2010; 234:163-176.



II. ETUDE DE STABILITE D'UN MELANGE D'UNE COMBINAISON DE DIX PARAMETRES / HUIT COULEURS POUR L'ETUDE DES LYMPHOCYTES T, B ET NK.

C. Chevalier, S. Dumartin, A. Dubois, S. Larcin, B. Husson, G. Detry

Laboratoire de Biologie Clinique, Hôpital de Jolimont, Haine-Saint-Paul (Belgique)

But :

La réalisation journalière de multiples panels de marqueurs conduit inmanquablement à des erreurs. Ces erreurs sont de plusieurs ordres : oubli d'un anticorps, mauvais anticorps, erreur de pipetage. Afin de remédier à ces inconvénients, nous avons étudié la stabilité sur 15 jours de notre combinaison de dix anticorps en huit couleurs utilisés pour l'étude de la répartition des populations lymphocytaires principales (Lymphocytes T helpers, Lymphocytes T cytotoxiques, Lymphocytes B et sous-populations lymphoïdes B et cellules NK) et l'étude de l'expression des chaînes légères kappa et lambda sur différentes sous-populations lymphoïdes B.

Matériels et méthode :

Nous avons préparé au jour J-21, J-19, J-14, J-12, J-7, J-5 et J0 la combinaison d'anticorps pour permettre la réalisation de 3 analyses. Le tube contenant le mélange a été protégé de la lumière par une feuille d'aluminium, conservés au réfrigérateur à 4°C. Les préparations réalisées ont suivi les mêmes cycles de conservation au frigo et d'utilisation à température ambiante que les anticorps utilisés en routine.

Nous avons ensuite prélevé deux témoins au jour 0 : un enfant et un adulte, et nous avons analysé les expressions médiane de fluorescence (MFI) et les proportions de population lymphocytaires en % pour toutes les populations décrite en routine pour ces deux patients en fonction de la durée de conservation des mélanges d'anticorps.

Les prélèvements ont été analysés sur un Facs Canto II® (BD). Les anticorps utilisés sont CD3 (PercP, clone SK7, BD ®), CD4 (V450, clone MOPC-21, BD ®), CD5 (APC, clone L17F12, BD ®), CD8 (FITC, clone UCH-T4, Cytognos ®), CD19 (PC7, clone SJ25C1, BD ®), CD20 (APCH7, clone L27, BD ®), CD45 (V500, clone HI30, BD ®), CD56 (PE, clone C5.9, Cytognos ®), Kappa (PE) et Lambda (FITC).

Résultats :

L'étude de la stabilité de l'expression des fluorescences moyennes sur les populations lymphoïdes au cours de notre test de trois semaines montre que celles-ci sont très stables aussi bien sur les populations positives que les populations négatives. Le coefficient de variation moyen observé est de 3%. On ne retrouve pas de tendance entre les expressions de fluorescence et l'âge des mélanges de fluorochromes réalisés. Ces variations d'expression n'ont pas de répercussion sur les proportions des différentes populations lymphoïdes étudiées dans notre combinaison (CV moyen de 3.8%). Les CV observés au cours de notre étude ont été comparés à un exercice de répétabilité sur un autre patient. Les CV obtenus dans ces deux exercices sont comparables.

Conclusion :

Nous n'observons aucune différence notable d'expression de fluorescence des différents fluorochromes étudiés dans cette combinaison sur notre période de trois semaines. La réalisation à l'avance de mélange de fluorochromes permet de simplifier le travail technique, de diminuer les imprécisions de pipetage, de réduire les erreurs de pipetage et faciliter la traçabilité des analyses réalisées.



III. NUMERATION DES CD3 POUR LES INJECTIONS DE LYMPHOCYTES DU DONNEUR PAR CYTOMETRIE EN FLUX SELON LA NORME NF EN ISO 15189

Albertine Plat (1), Jean Feuillard(1), Estelle Guerin(1), Marie-Laurence Destain(1), Magali Donnard(1)

(1) Laboratoire d'hématologie – Pôle de Biologie-hygiène – CHU DUPUYTREN, LIMOGES

Introduction :

Les injections de lymphocytes du donneur (DLI) sont utilisées pour leur effet antileucémique (GVL) dans le traitement des rechutes d'allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). Le laboratoire de Thérapie Cellulaire réalise une quantification précise des lymphocytes CD3 viables dans les greffons de CSH pour se conformer à la prescription du clinicien. L'objectif de cette étude est l'application des critères décrits par l'AFSSAPS pour l'habilitation du laboratoire de Thérapie Cellulaire : répétabilité, reproductibilité, linéarité, effet dilution.

Matériels et méthodes :

La quantification absolue des CD3 a été réalisée au moyen de billes calibrées StemCell Flow®, par une méthode de cytométrie en flux (CMF), sur NAVIOS (BECKMAN COULTER®). Une combinaison de cinq anticorps (CD3, CD19, CD16/CD56, CD45) est utilisée pour permettre la quantification des principales populations lymphocytaires de tous les greffons de CSH allogéniques. Les cellules mortes sont exclues au moyen d'un marqueur de viabilité 7-Amino-Actinomycine D. Les études de fidélité intermédiaires ont été réalisées sur les deux automates de CMF.

La répétabilité a été déterminée sur quatre essais, en répétant six fois la mesure, sur trois niveaux de valeurs de différents prélèvements (le Contrôle Interne Qualité (CIQ) Eurocell®, des prélèvements de Cellules Souches Périphériques (CSP) des lymphocytes sanguins concentrés en ficoll).

La reproductibilité a été établie sur dix valeurs du CIQ.

Trois études de linéarité ont été menées sur un domaine de mesure de 2,5 G/L à 20 G/L de CD3 sur CSP fraîche et ficoll de lymphocytes sanguins. Le domaine de linéarité a été étendu à 0 à 20 G/L de CD3 sur un seul des trois tests.

L'effet dilution a été étudié sur trois concentrations en leucocytes 10 G/L, 15 G/L et 20 G/L, sur trois prélèvements de CSP fraîches. L'effet contamination a également été évalué. Le CIQ est externalisé, permettant ainsi de calculer l'incertitude de mesure.

Resultats :

Les limites d'acceptabilité choisies pour la fidélité sont celles décrites par le laboratoire de contrôle des produits hématopoïétiques de l'AFSSAPS : CV acceptable < 10 %. Nous montrons une bonne répétabilité (CV de 2,04 %, 2,60 %, 5,12 % et 2,91 % selon niveau de valeur) et une bonne reproductibilité (CV = 4,32 %) de la méthode.

La méthode a été démontrée comme étant linéaire dans le domaine de concentration étudié ($R^2 = 0,997$, $R^2 = 0,998$ et $R^2 = 0,9997$).

Aucun effet dilution n'a été mis en évidence (CV = 2,4 %, 4 % et 3,5 % sur les niveaux bas, intermédiaire et haut de concentration). L'effet contamination est de l'ordre de 0,1 %.

Conclusion :

La technique de numération des CD3 a été validée selon les critères décrits par l'AFSSAPS. La méthode est répétable, reproductible, linéaire dans le domaine de mesure étudié. L'effet contamination est proche de 0.

D'autres essais sont actuellement en cours pour satisfaire aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 et valider plus globalement la technique selon une méthode de portée B flexible.



IV. EVALUATION DU CYTOMETRE EN FLUX ACCURI C6 POUR LA NUMERATION DES CELLULES SOUCHES CD34+.

C. Loosen⁽¹⁾, J-C Osselaer⁽²⁾, F. Mullier⁽¹⁾, N. Bailly⁽¹⁾, Y. Cornet⁽¹⁾, A. Dromelet⁽¹⁾, N. Neyman⁽¹⁾, B. Chatelain⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratoire d'hématologie, ⁽²⁾ Centre de Transfusion, Centre Hospitalier Universitaire de Mont-Godinne, 1 av. Dr. Thérasse, 5530 Yvoir, Belgique. claloosen@gmail.com

Introduction : La transplantation de cellules souches requiert une numération fiable des cellules CD34+. Grâce à un contrôle du volume de suspension cellulaire aspiré par sa pompe péristaltique, le cytomètre en flux Accuri C6 fournit directement une concentration cellulaire de phénotype déterminé. L'objectif de cette étude est d'évaluer sa capacité à mesurer en simple plateforme (SP) la concentration en cellules CD34+ sur les échantillons sanguins en pré- ou en post-donation ainsi que sur les prélèvements de cytophérèse.

Matériels et méthodes :

La numération des cellules CD34+ après double marquage CD45-FITC et CD34-PE a été réalisée sur 182 échantillons: 68 échantillons sanguins de pré-don, 52 poches de cytophérèse, 51 échantillons sanguins de post-don et 5 contrôles de qualité externes (CQ) UKNEQAS et ISP totalisant 11 échantillons.

La technique en double plateforme (DP) combine le pourcentage de CD34 de l'Accuri C6 (ADP) ou du Facs Canto II (FCDP) (BD Biosciences) à la leucocytose mesurée par l'analyseur d'hématologie Sysmex XE-2100. La mesure directe simple plateforme de l'Accuri C6 (ASP) nécessite l'application d'un facteur correctif obtenu à l'aide de billes Trucount. La mesure en simple plateforme sur Facs Canto II repose sur l'utilisation du Stem Cell Enumeration Kit (SCEK, BD Biosciences).

Résultats et discussion:

Sur tous les types d'échantillons testés, nous n'avons pas montré de différence entre la numération des cellules CD34+ par l'ASP et le SCEK ($p > 0.05$, $n=19$). Pour 30 poches de cytophérèse, il n'y a pas de différence entre la numération des CD34+ par l'ASP et le FCDP ($p=0,7548$). Pour 45 échantillons sanguins de pré-donation, la différence entre la numération des CD34+ par l'ASP et le FCDP est statistiquement significative (moyennes = 27,2 et 31,2 CD34+/ μ l respectivement, $p=0,0006$). Toutefois, tous les échantillons dont la numération en cellules CD34+ par la méthode FCDP était inférieure au seuil décisionnel de cytophérèse se sont également révélés être sous ce seuil par la méthode ASP (< 10 CD34+/ μ l). 7 échantillons sur les 39 dont la numération se situe au-dessus du seuil décisionnel de cytophérèse par la méthode FCDP présentaient une valeur inférieure à ce seuil avec l'ASP. Il faut toutefois souligner que ces 7 échantillons sanguins de pré-donation présentent des concentrations en CD34+ inférieures à 17 CD34+/ μ l par la méthode double plateforme sur Facs Canto II. La comparaison des résultats ASP et FCDP de 32 échantillons de post-don montre également une différence non cliniquement importante (moyennes respectives: 15,6 et 19,4 ; $p=0,0001$). Les résultats des 11 CQ analysés en parallèle sur l'ASP et le FCDP ne montrent pas de différence significative entre les 2 méthodes (moyennes respectives: 39,1 et 38,2 CD34+/ μ l ; $p=0,6404$). Le résultat de tous ces QC était compris dans les limites d'acceptabilité de la méthode SP.

.../...



.../...

Conclusion :

Les cellules souches CD34+ peuvent être dénombrées de manière exacte en simple plateforme sur le cytomètre en flux Accuri C6 et ce, tant dans des échantillons sanguins en pré- ou post-donation que dans des poches de cytophèrese.



V. HEMATOFLOW®: AMÉLIORATIONS DU LOGICIEL D'ANALYSE AUTOMATISÉ DE LA FORMULE SANGUINE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Kaoutar Allou, Jean-Philippe Vial, Francis Lacombe

Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Haut-Lévêque, CHU Bordeaux, Pessac, France

La numération formule sanguine fait partie des examens de base en hématologie biologique. Elle est réalisée de nos jours par des automates d'hématologie ; des alarmes identifient les résultats douteux et imposent à l'opérateur d'invalider la formule automate pour la remplacer par la lecture d'un frottis au microscope. Cette technique manuelle reste à l'heure actuelle la technique de référence.

Toutefois, face aux nombreux problèmes que pose la formule manuelle, en particulier le faible nombre de cellules comptées, de nouvelles approches de la formule sanguine émergent, notamment celles basées sur la cytométrie en flux (CMF). A ce jour, le seul système commercialisé est l'Hematoflow® de la société Beckman Coulter. Il s'agit d'un ensemble constitué par un préparateur d'échantillons, un cytomètre FC500 ainsi qu'une interface de validation. Il permet, grâce à la combinaison de 6 anticorps couplés à 5 fluorochromes et l'utilisation d'une stratégie de « gating » appropriée, la réalisation de la formule sanguine (identification et comptage de 13 populations leucocytaires).

Ce travail portant sur 782 échantillons normaux et pathologiques nous a permis dans un premier temps de valider les résultats de la formule cytométrique par comparaison à la formule manuelle. Au moyen d'une étude statistique basée sur l'étude des courbes ROC, des likelihood ratio, d'une base de données extensive et de l'optimisation d'un logiciel multiparamétrique d'analyse des données cytométriques, nous avons pu définir de nouvelles conditions pour l'analyse en CMF. D'autre part, nous avons développé des régions dites de « normalité » permettant la constitution de panels d'alarmes spécifiques afin d'invalider les échantillons à problème et de valider automatiquement les autres.

Ces avancées devraient permettre aux techniciens de laboratoire et aux biologistes d'apprécier de manière plus objective les conditions de revue des lames de frottis sanguin et d'améliorer la détection et la quantification de sous populations leucocytaires non identifiables sur les frottis.

La CMF sera de plus en plus indispensable pour la réalisation de la formule sanguine et devrait rapidement trouver sa place en routine sur un plateau technique d'hématologie.



VI. STUDY OF A « NO-LYSE/NO-WASH » PROTOCOL ON HUMAN BLOOD SAMPLES ON THE ATTUNE ACOUSTIC FOCUSING CYTOMETER

P.-H. Commere⁽¹⁾, V. Monceaux⁽²⁾, L. Huerta⁽¹⁾, P. Esterre⁽²⁾, M.-N. Ungeheuer⁽²⁾ & M. Nguyen⁽¹⁾.

⁽¹⁾Plateforme de Cytométrie – Imagopole, Institut Pasteur, Paris

⁽²⁾Plateforme ICAReB, Institut Pasteur, Paris

A « no-lyse/no-wash » protocol would be convenient for blood analyses since blood samples would be minimally perturbed, moreover, it requires less sample handling decreasing the risk of human error and/or accident. However, if no wash is performed, the sample should at least be diluted to avoid non specific reaction of the antibodies. Adequate dilution of the sample would increase tremendously its volume and it would require much longer acquisition time. A « no-lyse-no-wash » protocol was compared to a « lyse-wash » protocol for sub-populations phenotyping of human peripheral blood samples, provided by the ICAReB platform. This comparison was performed on the recently commercialised Attune acoustic focusing cytometer (*Life Technologies*) and the Cyan ADP flow cytometer (*Beckman Coulter*). We obtained similar results using the « no-lyse-no-wash » and « lyse-wash » protocols on both cytometers. However, the Attune was four times faster than the Cyan ADP. With the « no-lyse-no-wash » protocol, the acquisition time remained high : 1-2 min to acquire 10,000 events on the Attune and 4-8 minutes on the Cyan ADP. Further results on the Attune Cytometer will be presented.



VII. PLACE DE L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE (HPN) DIAGNOSTIQUEE PAR CYTOMETRIE EN FLUX (CMF) DANS LES APLASIES MEDULLAIRES

S.Oukid, S.Taoussi, K.M.Benlabiod, Y. Bouchakor, N. Rekab, C. Boucherit, H. Brahim, C. Guezlane, N. Maifi, F. Lamraoui, M.T. Abad

Service Hématologie, EHS ELCC Blida, Algérie.

Introduction

Des études récentes ont montré que 20 à 25% des aplasies médullaires présentent un clone HPN. Nous rapportant 43 cas d'aplasie médullaire où le clone HPN a été recherché par CMF.

Méthodes d'étude

Il s'agit d'une étude prospective ouverte ayant démarré en Août 2009. L'analyse comprend une étude clinique, biologique, cytologique, un test de Ham Dacie et une CMF faite sur un cytometre 04 couleurs. Cette technique évalue le degré de déficit du CD 55 et CD 59 sur les polynucléaires neutrophiles et les globules rouges. Le diagnostic de certitude en pratique est la détection de plus de 5% de cellules déficitaires en CD59 sur les deux lignées.

Matériels d'études

IL s'agit de 23 femmes et 20 hommes avec une moyenne d'âge de 33 ans (15 - 62 ans).

Délai moyen diagnostique de l'aplasie médullaire : 03 mois (07 jours - 14 mois).

Les motifs de consultation : Anémie : 24 cas, hémorragies : 13 cas, insuffisance sanguine : 03 cas, anémie sur grossesse : 02 cas et thrombose : 01 cas. La ponction biopsie osseuse a confirmé l'aplasie médullaire dans tous les cas : modéré : 31 cas, sévère : 12 cas. Le test de Ham Dacie a été réalisé dans 04 cas : positif dans tous les cas. Le délai écoulé pour assurer le diagnostic d'HPN est de 43 mois (02-196).

Résultats

Le déficit portant sur les 02 protéines CD55 et CD59 et dans les deux populations cellulaires a été retrouvé dans 12 cas soit 27,9% ; il s'agissait dans 11 cas d'une aplasie médullaire modérée et dans un cas d'un type sévère ; dans un cas le déficit est apparu en cours d'évolution. Ce déficit a été noté chez 04 femmes et 08 hommes avec une moyenne d'âge de 39 ans (19 - 56). Les circonstances ayant accompagné ce diagnostic : anémie : 12 cas ; grossesse : 01 cas ; thrombose : 01 cas ; signe d'hémolyse : 04 cas. Le test d'Ham Dacie positif : 03 cas. Le degré moyen du déficit du CD59 sur les polynucléaires neutrophiles est de 58 % (06 - 94) et sur les globules rouges de 26 % (07 - 60). Le type de déficit en molécules GPI partiel (II) : 03 cas, total (III) : 01 cas, mixte : 08 cas. Devenir des patients: pour 12 cas HPN : greffé : 01 cas, sous Ciclosporine : 04 cas : évolution favorable: 02 cas, stable : 01cas et rechute : 01 cas, sous Nilevar : 04 cas et sous traitement symptomatique : 03 cas. Médiane de survie : 71 mois (04-279) ; 04 patients on développé des thromboses au cours de l'évolution. Il faut relever que chez deux patientes atteintes d'aplasie médullaire modérée, un déficit modéré (14 et 24 %) a été retrouvé sur les PN mais absent sur les globules rouges et les monocytes, ce qui implique une surveillance rapprochée par CMF itérative. Enfin, dans un cas diagnostiqué par test de Ham Dacie, la CMF n'a pas retrouvé de clone HPN, un recontrôle par test de Ham Dacie est revenu négatif.

Commentaires

Dans notre étude, la CMF a été déterminante pour le diagnostic de l'HPN. Elle devrait être pratiquée devant toute aplasie médullaire à la recherche d'un clone HPN car elle est plus sensible et plus spécifique que les tests traditionnels et doit être refaite régulièrement surtout en cas d'association de signes d'hémolyse.



VIII. INTERET DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX A LA PHASE AIGUE DU SEPSIS

E Guerin (1); M Orabona (2); E Perrodeau (3); B Francois (2); J Feuillard (1).

- (1) Laboratoire d'Hématologie/Umr Cnrs 6101, Centre Hospitalier Universitaire, Limoges;
(2) Réanimation Polyvalente/Cic 0801, Centre Hospitalier Universitaire, Limoges;
(3) Biostatistiques/Cic 0202, Centre Hospitalier régional et Universitaire, Tours.

Introduction

Le Sepsis est la deuxième cause de décès en réanimation, son diagnostic repose actuellement sur des critères peu sensibles et peu spécifiques. Sur le plan hématologique, seule la numération des granuleux est prise en compte sans information sur leur état d'activation et d'immaturité. Le but de cette étude prospective est d'évaluer l'intérêt diagnostique et pronostique de la quantification de populations leucocytaires par cytométrie en flux, à la phase aigue du Sepsis.

Patients et méthodes

Entre avril 2010 et juin 2011, tous les patients admis au CHU de Limoges pour un Sepsis évoluant depuis moins de 24 heures étaient éligibles. Les patients inclus avaient au moins 2 critères de SRIS (Syndrome de réponse inflammatoire systémique) et une infection documentée cliniquement ou bactériologiquement. Les critères d'exclusion étaient la grossesse, un âge < 18 ans, les cancers et un traitement immuno-suppresseur. Selon les définitions de la conférence de consensus et après analyse par deux experts indépendants, les patients ont été répartis en 3 groupes de gravité à l'inclusion: Sepsis, Sepsis sévère et choc septique. Pendant 7 jours, les données cliniques et biologiques étaient colligées. En fonction des défaillances d'organes intervenant dans les 48H, un profil évolutif était attribué. Au plan hématologique, une NFS était réalisée à l'inclusion ainsi qu'une étude de 30 sous-populations leucocytaires par cytométrie en flux en 5 à 10 couleurs. Les valeurs normales de ces populations ont été déterminées durant la même période à partir de 50 témoins sains. Les résultats ont été comparés aux témoins par le test de Wilcoxon. Des seuils pour le Sepsis ont été établis par des courbes ROC. L'évolution précoce des patients a été comparée à l'aide du test de Kruskal Wallis.

Resultats

178 patients consécutifs ont été inclus, soit 83 Sepsis (57+/-22 ans), 66 Sepsis sévères (62+/-17ans) et 29 chocs septiques (63+/-14 ans) pour lesquels ont été observés respectivement 0%, 8 % et 35 % de mortalité. Par rapport aux sujets témoins, la population granuleuse, en particulier la proportion de granuleux immatures et les granuleux CD64+ ($p < 0.0001$), était augmentée ainsi que la population monocyttaire ($p = 0.001$). Les lymphocytes totaux, CD4+, CD8+, T régulateurs, T activés (DR+, CD38+ et CD25+), les DC2 ($p < 0.0001$), les CD19 ($p = 0.02$) étaient diminués. Les cellules CD34+, les DC1, les plasmocytes ne variaient pas. Les fluctuations des granuleux immatures (CD16 dim, CD10-) sont influencées par l'évolution du Sepsis.

Conclusion

Ces résultats démontrent que les populations sanguines augmentées lors du Sepsis sont celles de la réponse immune non spécifique (granuleux, granuleux immatures, monocytes inflammatoires) alors que les cellules de l'immunité spécifique (DC2, populations lymphocytaires) sont globalement diminuées. De plus, certains marqueurs granuleux (CD16 et CD10) sont prédictifs de l'évolution du Sepsis.



IX. ÉTUDE FONCTIONNELLE DE SMAP1 : UN NOUVEAU À LA CROISÉE DE L'ONCOGÈNE ET DE TRAFIC VÉSICULAIRE

Fatiha Sangar, Claudia Umaña-Diaz, Mathieu Boissan, Marie-Lise Lacombe, Françoise Praz

INSERM UPMC UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine

L'instabilité des séquences répétées microsatellites résultant d'un défaut de réparation post-répllicative est responsable de l'apparition de tumeurs dites de phénotype MSI (MicroSatellite Instability). Ces tumeurs sont caractérisées par l'accumulation de mutations par insertion/délétion dans des répétitions mononucléotidiques codantes de gènes considérés comme "cibles" de l'instabilité des microsatellites.

Le gène SMAP1 (Small ArfGAP1) comporte une répétition de 10 adénines (A10) mutée dans 73% des cancers colorectaux MSI. Ce gène code une protéine de la famille ArfGAP (ADP ribosylation factor-GTPase Activating Protein) spécifique d'Arf6, possédant également un domaine de liaison à la clathrine (CB, Clathrin Box). SMAP1 serait impliquée dans l'endocytose clathrine-dépendante de protéines membranaires comme le récepteur à la transferrine (TfR) et la E-cadhérine. Les mutations de SMAP1 caractéristiques des tumeurs MSI aboutissent à la synthèse d'une protéine tronquée dégradée par le protéasome et sont donc de type « perte-de-fonction ».

Pour étudier le rôle de SMAP1 dans l'oncogénèse MSI, nous avons utilisé la lignée cellulaire d'origine colique HCT116 (SMAP1^{mut}) et trois clones dérivés exprimant de manière stable l'ADNc SMAP1 sauvage (HCT116-SMAP1).

1. L'internalisation du TfR, analysée par cytométrie en flux, est comparable dans les cellules HCT116 parentales et les clones HCT116-SMAP1. En revanche, le recyclage précoce du TfR est significativement accéléré dans les cellules HCT116-SMAP1.

2. L'expression membranaire de la E-cadhérine, protéine majeure des jonctions adhérentes, analysée par immunofluorescence et cytométrie en flux est diminuée dans les cellules HCT116-SMAP1. La E-cadhérine étant impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse, nous avons étudié ce phénomène ainsi que le pouvoir invasif des cellules. La diminution de la E-cadhérine à la membrane plasmique s'accompagne également d'une diminution de son expression par western blotting dans les cellules HCT116-SMAP1 et de la relocalisation de la β -caténine dans le noyau des cellules. Ces altérations s'accompagnent d'une augmentation du pouvoir invasif des clones HCT116-SMAP1 à travers le Matrigel (matrice extra-cellulaire mimant la membrane basale).

3. Arf6 étant impliqué dans la cytokinèse, étape finale de la mitose, nous avons étudié la prolifération et le cycle cellulaire. Les clones HCT116-SMAP1 prolifèrent moins rapidement, en raison de l'allongement de la phase G2/M. L'expression de SMAP1 dans les cellules HCT116 diminue aussi la taille et le nombre des clones obtenus dans un test de clonogénicité. En conclusion, les mutations de SMAP1 diminuent le pouvoir invasif des cellules tumorales et augmentent leur capacité proliférative. Ces résultats sont en accord avec les observations cliniques montrant que les tumeurs MSI sont généralement volumineuses et ont un pouvoir métastatique diminué.



X. L'APPLICATION DE LA FISH INTERPHASIQUE A L'ÉTUDE DES ANEUPLOÏDIES DANS LES PRODUITS D'AVORTEMENTS SPONTANÉS

S. Mellali⁽¹⁾, *K. Haoud*^(1,2), *L. Mohamadi*⁽¹⁾, *S. Moulessehoul*⁽¹⁾, *P. Vago*⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire de Biotoxicologie, Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès, Algérie ;

⁽²⁾ Service de cytogénétique médicale, Faculté de médecine, Clermont-Ferrand ;

(sara.mellali@yahoo.fr)

Les avortements spontanés sont un problème fréquent de la grossesse, en effet 10 à 20 % des grossesses cliniquement reconnues avortent de façon sporadique par sélection naturelle.

La cause génétique explique les 2/3 de ces échecs de grossesse. Les anomalies de caryotype foetal, principalement numériques, sont retrouvées dans presque 70% des produits d'avortements du premier trimestre. Ce taux retombe à 20% pendant le deuxième trimestre.

En raison des fréquents échecs de culture et des délais longs qui peuvent aller jusqu'à 3 semaines, nous avons opté pour la cytogénétique moléculaire, et particulièrement *l'hybridation in situ fluorescente* (FISH) sur noyaux Interphasiques, car elle permet une analyse cytogénétique rapide des caryotypes des produits d'avortements spontanés.

Nous rapportons ici l'analyse cytogénétique moléculaire des villosités chorales issues de produits de curetage de 15 patientes souffrant d'avortement spontané, avec des âges de gestation variant de la 8^{ème} à la 18^{ème} semaine. La technique Interphase FISH a été appliquée à nos échantillons afin de visualiser les aneuploïdies les plus fréquentes qui pourraient être à l'origine de ces pertes foetales dans le but final d'évaluer la fiabilité et la précision de cette technique.

Nous avons relevé la présence de trois cas pathologiques représentés par deux cas du Syndrome de Turner et un autre du Syndrome de Down. Les autres résultats étaient équilibrés pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y mais les sondes utilisées n'ont pas permis d'écarter la possibilité de la présence d'autres anomalies.

La FISH sur noyaux interphasiques est fiable, rapide (délai ne dépassant pas 24 heures) et précise, mais reste un examen de deuxième intention (après le caryotype conventionnel) car onéreuse et ne détectant que des anomalies ciblées.

En parallèle une étude statistique a été réalisée chez 949 patientes ayant subi des avortements spontanés enregistrées au niveau de la maternité de Sidi Bel Abbes, Algérie durant l'année 2009. L'âge maternel, premier facteur de risque, a montré un pic entre 35 et 39 ans. L'incidence des ces avortements spontanés est d'environ 10% par rapport au nombre total de grossesses enregistrées, les 2/3 survenant tardivement. 4 % des femmes recrutées ont testé trois avortements successifs, ce qui est largement au dessus de la moyenne enregistrée lors des études précédemment réalisées et qui se situe entre 0.4 et 1% seulement

Mots clés : Avortement spontané, Anomalies chromosomiques, Villosités chorales, Interphase FISH.



XI CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET INCIDENCE D'UN EXTRAIT LIPIDIQUE DE MOULES ISSUES DE LA CÔTE ATLANTIQUE MAROCAINE SUR LE MÉTABOLISME DES CELLULES b PANCRÉATIQUES MURINES (MIN6)

Boumhras Mohamed^{1,2}, cherkaoui-malki¹ Mustapha, nasser Boubker², lizard Gérard¹

1) Laboratoire de Biochimie Métabolique et Nutritionnelle, centre de recherche Inserm U866 (Lipides, Nutrition, Cancer), Université de Bourgogne, Faculté des Sciences Gabriel Groupe: 6, Bd Gabriel 21000 Dijon, France

(2) Laboratoire de Biochimie et Neurosciences, Groupe de Toxicologie Appliquée . Université Hassan 1^{er}, Faculté des Sciences et Techniques, route de Casablanca, BP 577, 26000 Settat. Maroc.

Le Maroc possède une importante richesse maritime qui contribue à son développement socioéconomique. Des études préalables ont montré que cet environnement marin au niveau de certains sites contient des polluants provenant des rejets industriels, agricoles et/ou domestiques. Les bivalves marins, tels que les moules, pourraient concentrer les polluants et avoir des effets néfastes sur la santé humaine par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire.

Dans un premier temps, nous avons effectué une analyse de l'extrait lipidique de moules (*Mytilus galloprovincialis*) issues de la côte atlantique marocaine en métaux lourds (Cd, Cr et Pb) et en lipides (acides gras, cholestérol, oxystérols, phytostérols et phospholipides).

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé une lignée de cellules bdeuxième temps, nous avons utilisé une lignée de cellules s ules et Pb) etCette lignée est immortalisée, non tumorale et insulino-sécrétrice. Elle répond au glucose à des concentrations de 5 à 25 mM. Ensuite, nous avons étudié les effets cytotoxiques et pro-oxydants de l'extrait lipidique à différentes concentrations (25 à 400 mg/mL). L' incidence sur l' équilibre RedOx et la mort cellulaire a été évaluée, ainsi que les effets sur les caractéristiques biophysiques de la membrane cytoplasmique. La fonction des cellules MIN6 a été évaluée par dosage du taux de sécrétion d'insuline. L'ensemble des tests ont été effectués dans des conditions normro-glycémiques (5mM) et hyper-glycémiques (25mM).

In vitro, nous avons montré par cytométrie en flux que le traitement des MIN6 avec l'extrait lipidique induit une surproduction d'espèces radicalaires de l'oxygène et de l'azote et une perturbation des défenses anti-oxydantes (catalase, GSH). L'extrait lipidique induit aussi la mort des cellules MIN6 par un processus non apoptotique, une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, une déstabilisation des lysosomes et il perturbe aussi la fluidité membranaire. Une sensibilité des cellules MIN6 a été remarqué en présence de l'extrait lipidique, qui se traduit par une stimulation plus forte de la sécrétion d'insuline

Les résultats obtenus nous conduisent à émettre l'hypothèse que la consommation par des métaux lourds pourrait entraîner une lipotoxicité chez le consommateur. Cependant, l'extrapolation à l'homme des résultats de cette étude toxicologique ne peut être complète que si des études épidémiologiques à grande échelle et sur une longue période sont réalisées

Mots-clés : moule, métaux lourds, MIN6, lipotoxicité, stress oxydant, cytométrie en flux

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Liste des Participants



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

ABBACI Muriel

Plate-forme imagerie et cytométrie
Institut Gustave Roussy
114, rue Edouard Vaillant
94800 VILLEJUIF – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 11 60 15
muriel.abbaci@igr.fr

ABRASSART Guy

Alexion Belgium
Rue de la Régence 58
1000 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 26 63 05 43
sonia@btstravel.be

ALBAUD Joanna

Sciences du vivant
L'Oréal
90, rue du général Roguet
92583 CLICHY Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)147568879
Fax : +33 (0)1 47 56 80 46
jalbaud@rd.loreal.com

ANDRIEU Thibault

Inserm - IFR128
21, avenue Tony Garnier
69007 LYON – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 37 28 23 32
Fax : +33 (0)1 46 54 77 26
thibault.andrieu@inserm.fr

ARNAUD Bertrand

Laboratoire d'hématologie
CH Laennec
Centre hospitalier de Cornouaille
14, avenue Y. Thépot
29000 QUIMPER – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 98 52 60 88
b.arnaud@ch-cornouaille.fr

ARNAUD Laurent

Laboratoire d'hématologie
CHU Conception
147, boulevard Baille
13385 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 38 25 94
Fax : +33 (0)4 91 38 30 12
laurent.arnaud@ap-hm.fr

ARNOUX Isabelle

Laboratoire d'hématologie
CHU Timone
264, rue Saint Pierre
13385 MARSEILLE Cedex 5 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 38 57 87
Fax : +33 (0)4 91 94 23 32
isabelle.arnoux@ap-hm.fr

AUJOULAT Michel

Laboratoire d'évaluations biologiques
Ricerca Biosciences
"Les Oncins"
329, impasse du domaine Rozier
69210 ST-GERMAIN-SUR-L'ABRESLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 74 01 63 57
Fax : +33 (0)4 74 26 46 35
michel.aujoulat@ricerca.com

AUMONT Cédric

CHR Metz-Thionville
20, rue dragon
57000 METZ – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 87 55 38 04
c.aumont@chr-metz-thionville.fr

BAATOUT Sarah

Radiologie
Centre d'Etudes de l'Energie Nucléaire
Boeretang 200
B-2400 MOL – BELGIQUE
Tél. : +32 14 33 27 29
Fax : +32 14 31 47 93
sbaatout@sckcen.be

BAILLOU Claude

UPMC - UMR 7211
Hôpital Pitié Salpêtrière
Bât. CERVI, 2e étage
75013 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 17 74 58
Fax : +33 (0)1 42 17 74 41
claud.baillo@upmc.fr

BAILLY Nicolas

Laboratoire d'hématologie
UCL Mont-Godinne
1, avenue Dr Gaston Thérasse
B-5530 YVOIR – BELGIQUE
Tél. : +32 81 42 32 23
Fax : +32 81 42 32 04
nicolasbailly.mtg@gmail.com

BANER Thomas

eBioscience
Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2
1030 VIENNA – AUSTRIA
Tél. : +43 1796 4040 121
thomas.baner@ebioscience.com

BASEGGIO Lucile

Laboratoire d'hématologie cellulaire
CH Lyon Sud
165, chemin du Grand Revoyet
69495 PIERRE-BÉNITE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 78 56 90 20
Fax : +33 (0)4 78 86 33 40
lucile.baseggio@chu-lyon.fr

BASTIEN David

Partec
14-16, rue Gallieni
91700 SAINTE GENEVIÈVE DES BOIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 69 04 87 12
Fax : +33 (0)1 69 04 90 38
partecfrance@partec.com

BATARD Sandrine

Nikon France
191, rue du Marché Rollay
94504 CHAMPIGNY SUR MARNE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 45 16 46 60
Fax : +33 (0)1 45 18 45 55
sandrine.batard@nikon.fr

BAUDOUIN Françoise

Institut de la Vision
17, rue Moreau
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 46 25 69
francoise.brignole@inserm.fr

BECK Michaël

SCK-CEN
Boeretang 200
2400 MOL – BELGIQUE
Tél. : +32 143 32 818
mbeck@sckcen.be

BELLE-MOUDOUROU François Philippe

CHU Dupuytren
2, avenue Martin Luther King
87042 LIMOGES – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 55 05 61 84
Fax : +33 (0)5 55 05 80 54
laboratoire.immunologie@chu-limoges.fr

BÉNÉ Marie-Christine

Laboratoire d'immunologie
CHU Nancy-Brabois
9, allée du Morvan
54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 83 15 76 15
Fax : +33 (0)3 83 15 76 60
bene@medecine.uhp-nancy.fr

BENSOUSSAN Danièle

UTCT
CHU Nancy-Brabois
Allée du Morvan
54511 VANDOEUVRE-LES-NANCY – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 83 15 37 79
Fax : +33 (0)3 83 15 37 56
d.bensoussan@chu-nancy.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

BEQ Stéphanie

Cythéris
175, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 ISSY-LES-MOULINEAUX Cedex –
FRANCE
Tél. : +33 (0)1 58 88 38 00
Fax : +33 (0)1 46 44 44 46
sbeq@cytheris.com

BERNAUD Janine

Immuno cellulaire
EFS Rhône-Alpes
1, rue du Vercors
69007 LYON – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 72 71 17 22
janine.bernard@efs.sante.fr

BERNOT Denis

Laboratoire d'hématologie
Hôpital Timone
264, rue Saint-Pierre
13385 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 38 43 80
denis.bernot@ap-hm.fr

BERTHO Nicolas

Virologie et immunologie moléculaires
Inra
Domaine de Vilvert
78352 JOUY-EN-JOSAS CEDEX – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 34 65 26 11
Fax : +33 (0)1 34 65 26 21
nicolas.bertho@jouy.inra.fr

BERTRAND Christophe

Enzo Life Sciences
11, Avenue Albert Einstein
69100 VILLEURBANNE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 72 44 06 55
Fax : +33 (0)4 37 48 42 39
cbertrand@enzolifesciences.com

BIICHLÉ Sabeha

UFR-SMP-UMR 645
EFS BFC
1, boulevard A. Fleming
25000 BESANÇON Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 81 61 56 15
Fax : +33 (0)3 81 61 56 17
sabeha.biichle@univ-fcomte.fr

BILLOT Maryse

Immunologie cellulaire
Etablissement Français du Sang
1, boulevard Alexandre Flemming
BP 1937
25020 BESANÇON Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 81 61 56 15
Fax : +33 (0)3 81 61 56 17
maryse.billot@efs.sante.fr

BLANC Catherine

Plate-forme de cytométrie en flux CyPS
UPMC
Site Pitié Salpêtrière
105, boulevard de l'Hôpital
75013 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 77 95 73
Fax : +33 (0)1 40 77 98 42
catherine.blanc@upmc.fr

BLAVIGNAC Christelle

Centre Imagerie Cellulaire Santé
Faculté de Médecine
28, place Henri Dunant
63000 CLERMONT-FERRAND Cedex –
FRANCE
Tél. : +33 (0)4 73 17 80 88
Fax : +33 (0)4 73 17 81 69
christelle.blavignac@u-clermont1.fr

BLONDEL Bruno

Biologie des virus entériques
Institut Pasteur
28, rue du Docteur Roux
75724 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 61 35 90
bruno.blondel@pasteur.fr

BOBICHON Isabelle

Immunocytometry Systems
BD Biosciences
11, rue Aristide-Bergès
38800 LE PONT-DE-CLAIX Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 76 68 32 98
Fax : +33 (0)4 76 68 35 04
isabelle_bobichon@europe.bd.com

BOGGETTO Nicole

IJM - UMR 7592
CNRS Université Paris 7
4, rue Marie-Andrée Lagroua Weill Hallé
75205 PARIS Cedex 13 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 57 27 81 52
boggetto.nicole@ijm.univ-paris-diderot.fr

BOLTE Susanne

Imagerie cellulaire et cytométrie
IFR 83 - Biologie intégrative - UPMC
7-9, quai Saint-Bernard
Bâtiment B, 7e étage
75252 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 27 20 11
Fax : +33 (0)1 69 82 33 55
susanne.bolte@upmc.fr

BOUHARB Assaf

CEBIODI
Rue du Merlo, 138
B-1180 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 47 56 95 007
abouhcarb@clstjean.be

BOUILLY Dominique

CETEP
1, rue de l'Arsenal
Sereville
28300 MAINVILLIERS – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 37 20 02 60
Fax : +33 (0)2 37 20 08 18
cetep@wanadoo.fr

BOUIX Marielle

AgroParisTech
GMPA-CBAI
78850 THIVERVAL-GRIGNON – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 30 81 45 34
marielle.bouix@agroparistech.fr

BOURGE Mickael

Plate-forme de cytométrie
CNRS - IFR87
Bâtiment 23/24,
Avenue de la Terrasse
91198 GIF-SUR-YVETTE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 60 82 38 06
Fax : +33 (0)1 60 82 36 95
mickael.bourge@isv.cnrs-gif.fr

BOURICHE Tarik

R&T
BioCytex
140, chemin de l'Armée d'Afrique
13010 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 96 12 21 76
tarik.bouriche@biocytex.fr

BREMONT Julie

Alexion Pharma France
15, Boulevard De L'amiral Bruix
75016 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 64 39 52
Fax : +33 (0)8 05 54 01 28
bremontj@alxn.com

BRET Caroline

Laboratoire central d'hématologie
CHU Saint-Eloi
80, avenue Augustin Fliche
34295 MONTPELLIER Cedex 5 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 67 33 70 44
Fax : +33 (0)4 67 33 70 36
caroline.bret@inserm.fr

BROUSSAS Matthieu

Cancérologie expérimentale
Institut de Recherche Pierre Fabre
5, avenue Napoléon III
BP 60497
74164 SAINT-JULIEN-EN-GENEVOIS –
FRANCE
Tél. : +33 (0)4 50 35 35 55
Fax : +33 (0)4 50 35 35 90
matthieu.broussas@pierre-fabre.com



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

BROWN Spencer

Institut des Sciences du Végétal
CNRS
Bâtiment 23
Avenue de la Terrasse
91198 GIF-SUR-YVETTE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 69 82 38 04
Fax : +33 (0)1 69 82 36 95
spencer.brown@isv.cnrs-gif.fr

BRUNET Corinne

CH Conception
147, boulevard Baille
13295 MARSEILLE Cedex 05 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 38 27 04
corinne.brunet@ap-hm.fr

CALCO Valérie

CNRS UPR 3212 INCI
5, rue Blaise Pascal
67084 STRASBOURG – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 88 45 67 44
Fax : +33 (0)3 88 45 60 64
calco@unistra.fr

CAMPILLO-GIMENEZ Laure

Inserm U945
Hôpital Pitié-Salpêtrière
83, boulevard de l'Hôpital
75013 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 17 75 17
laure.campillo@inserm.fr

CAMPOS Lydia

Laboratoire d'hématologie
CHU Saint-Etienne
Pavillon de biologie - Hôpital Nord
Avenue Albert Raimond
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 77 82 83 63
Fax : +33 (0)4 77 82 86 99
lydia.campos@chu-st-etienne.fr

CANINO Claudio

Immunotech SAS
130, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny
BP 177
13276 MARSEILLE Cedex 9 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 17 27 00
ccanino@beckman.com

CANTINIEUX Brigitte

Laboratoire d'hématologie
CHU Saint-Pierre
322, rue Haute
B-1000 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 2 535 45 77
Fax : +32 2 535 46 56
brigitte_cantinieaux@stpierre-bru.be

CANTO Pierre-Yves

Biologie du développement UMR 7622
CNRS / UPMC
9, quai Saint Bernard
75252 PARIS Cedex 05 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 27 58 40
pierre-yves.canto@upmc.fr

CAPIOD Jean-Claude

Laboratoire d'hématologie
CHU Amiens - Hôpital Nord
Rue Laennec
80480 SALOUEL Cedex 01 – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 22 45 59 70
capiod.jean-claude@chu-amiens.fr

CASULA Daniele

Cliniques St Pierre
Rue Haute 322
1000 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 26 63 05 40
sonia@btstravel.be

CASULLI Sarah

Immunité et infection
Inserm U945
83, boulevard de l'Hôpital
75013 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 17 75 17
sarah.casulli@laposte.net

CAZARETH Julie

Plateforme imagerie
CNRS IPMC UMR 6097
660, route des Lucioles - Sophia Antipolis
06560 VALBONNE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 93 95 77 83
Fax : +33 (0)4 93 95 77 08
cazareth@ipmc.cnrs.fr

CHAPAT Ludivine

Mérial
254, rue Marcel Mérieux
BP39H
69007 LYON – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 72 72 33 80
Fax : +33 (0)4 72 72 33 16
ludivine.chapat@merial.com

CHARPENTIER Agnès

Hôpital Saint-Philibert
115, rue du Grand But
BP 249
59462 LOMME Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 20 22 50 10
Fax : +33 (0)3 20 22 50 11
charpentier.agnes@ghicl.net

CHATELAIN Bernard

Service d'hématologie
Cliniques Universitaire UCL
1, avenue Gaston Therasse
5530 YVOIR – BELGIQUE
Tél. : +32 81 42 32 43
Fax : +32 81 42 32 04
bernard.chatelain@uclouvain.be

CHAUDON Olivier

PerkinElmer
Za Courtaboeuf
16, Avenue Du Québec - Bâtiment Lys
91940 VILLEBON SUR YVETTE – FRANCE
Tél. : +33 (0)8 05 11 13 33
olivier.chaudon@perkinelmer.com

CHEVALIER Charles

Hématobiologie
Hôpital de Jolimont
159, rue Ferrer
7100 HAINÉ-ST-PAUL – BELGIQUE
Tél. : 04 79 99 27 75
chevaliercharles@hotmail.com

CLAY Denis

Inserm U972
14, avenue Paul Vaillant Couturier
94800 VILLEJUIF – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 45 59 53 04
Fax : +33 (0)1 45 59 53 29
denis.clay@inserm.fr

COLLURA Ada

Inserm
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 28 66 72
ada.collura@inserm.fr

COMBRISSEON Jérôme

Analytical Sciences
Danone Research
R.d.128
91767 PALAISEAU Cedex – FRANCE
jerome.combrisson@danone.com

COMMÈRE Pierre-Henri

Plate-forme de cytométrie
Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux
75724 PARIS Cedex 15 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 45 68 85 38
pierre-henri.commere@pasteur.fr

CONTI Filomena

Unité de transplantation hépatique
Hôpital Saint-Antoine
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 71 97 01 67
Fax : +33 (0)1 71 97 01 57
filomena.conti@sat.aphp.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

CORDIER Corinne

Service commun de tri cellulaire
Inserm IFR94
Faculté de Médecine Necker
156, rue de Vaugirard
75015 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 61 56 86
corinne.cordier@inserm.fr

CORNEAU Aurélien

CEA
18, route du Panorama
92265 FONTENAY-AUX-ROSES – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 46 54 94 82
Fax : +33 (0)1 46 54 77 26
aurelien.corneau@cea.fr

CORNET Yvan

Laboratoire d'hématologie
UCL Mont-Godinne
Avenue Docteur Gaston Thérèse, 1
B-5530 YVOIR – BELGIQUE
Tél. : +32 81 42 32 02
Fax : +32 81 42 32 04
yvan.cornet@uclouvain.be

CORRE Jill

Laboratoire d'hématologie
CHU Toulouse
Place du Docteur Baylac
31059 TOULOUSE – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 61 77 90 82
Fax : +33 (0)5 61 77 76 95
corre.j@chu-toulouse.fr

COSMA Antonio

Division of Immuno-Virology
CEA / IMETI
18, route du Panaorama
92265 FONTENAY-AUX-ROSES – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 46 54 82 84
Fax : +33 (0)1 46 54 77 26
antonio.cosma@cea.fr

DA ROCHA Alice

Université Paris Diderot
darocha@biologie.ens.fr

DALIPHARD Sylvie

Laboratoire d'hématologie
CHU Robert Debré
Avenue du Général Koenig
51092 REIMS Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 26 78 77 89
Fax : +33 (0)3 26 78 81 71
sdaliphard@chu-reims.fr

DANILOVA Anna

Biothérapie du Cancer
Institut d'Oncologie Petrov
Rue Leningradskaya, 68
197758 SAINT-PETERSBURG – RUSSIA
Tél. : 007 812 596 65 16
lilas_fleurit@yahoo.com

DARAKDJIAN Jérôme

BD Biosciences
11, rue Aristide Berges
38800 LE PONT-DE-CLAIX – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 76 68 32 98
jdarakdjian@accuricytometers.com

DAUGUET Nicolas

Institut de Duve - UCL
Avenue Hippocrate 74
B1.74.04
1200 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 27 64 75 51
Fax : +32 27 64 75 90
nicolas.dauguet@uclouvain.be

DE BOISSET Isabelle

Marketing
Beckman Coulter
Paris Nord II - 33, rue des Vanesses
BP 54359 - Villepinte
95942 ROISSY CDG Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 90 92 44
Fax : +33 (0)1 49 90 91 60
ideboisset@beckman.com

DE GEYTER Hendrik

NV Analis
Leeuwerikstraat 28
9000 GHENT – BELGIQUE
Tél. : +32 92 43 77 10
hdg@analis.be

DE SCHOUWER Pieter

ZNA Stuivenberg
Lange Beeldekensstraat, 267
B-2060 ANTWERPEN – BELGIQUE
Tél. : +32 3 217 78 05
Fax : +32 3 217 78 12
pieter.deschouwer@zna.be

DE VOS Winnok

Ghent Université
Coupure Links 653
B-9000 GHENT – BELGIQUE
Tél. : +32 92 64 59 71
winnok.devos@ugent.be

DEBLIQUIS Agathe

Laboratoire d'hématologie
CHU de Mulhouse
87, avenue d'Altkirch
68051 MULHOUSE CEDEX – FRANCE
debliquisa@ch-mulhouse.fr

DEFRENAIX Pierre

Excilone
3, rue de la Mairie
78490 VICQ – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 34 86 77 01
Fax : +33 (0)1 34 86 77 53
pierre.defrenaix@excilone.com

DELORME Guillaume

Celgene
1, rue des Cirier
67100 STRASBOURG – FRANCE
gdelorme@celgene.com

DEMANET Christian

Laboratoire d'hématologie
Universitair Ziekenhuis Brussel
Laarbeeklaan, 105
B-1090 BRUSSELS – BELGIQUE
Tél. : +32 2 477 67 09
Fax : +32 2 477 67 28
christian.demanet@uzbrussel.be

DEMARTIN Sonia

Laboratoire d'hématologie
Hôpital de Jolimont
Rue Ferrer, 159
7100 HAINE-ST-PAUL – BELGIQUE
Tél. : +32 64 23 41 02
gautier.detry@entitejolimontoise.be

DEMUR Cécile

Laboratoire d'hématologie
Hôpital Purpan
Pavillon Lefebvre
Place Dr Baylac
31059 TOULOUSE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 61 77 90 70
Fax : +33 (0)5 61 77 76 95
demur.c@chu-toulouse.fr

DENYS Barbara

Ghent Université Hôpital
De Pintelaan 185
B-9000 GHENT – BELGIQUE
Tél. : +32 9 33 26 637
barbara.denys@ugent.be

DESFRAICOIS-NOËL Juliette

Plate-forme de cytométrie
Inserm U892 / IFR26
Batiment Irtun
8, quai Moncoussu
44007 NANTES Cedex 01 – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 28 08 02 42
juliette.desfrancois@nantes.inserm.fr

DEVÈVRE Estelle

Centre de Recherche des Cordeliers
15, rue de l'École de Médecine
75006 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 34 69 05
estelle.devevre@crc.jussieu.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

DOUAY Luc

Hématologie et d'immunologie biologiques
Hôpital Saint-Antoine
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75571 PARIS Cedex 12 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 28 22 72
Fax : +33 (0)1 49 28 30 46
luc.douay@sat.aphp.fr

DRÉNOU Bernard

Département d'hématologie
Centre Hospitalier de Mulhouse
Hôpital Emile Müller
20, rue du Docteur Laënnec - BP 1370
68070 MULHOUSE – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 89 64 77 85
Fax : +33 (0)3 89 64 77 87
drenoub@ch-mulhouse.fr

DRIS Salima

Laboratoire d'hématologie
Hôpital Nord - CHU Saint Etienne
Avenue Albert Raimond
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 77 82 83 63
Fax : +33 (0)4 77 82 55
lydia.campos@univ-st-etienne.fr

DRUPT François

Laboratoire de biologie SIH
Institut Curie - Hôpital René Huguenin
35, rue Dailly
92210 SAINT-CLOUD Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 47 11 15 63
Fax : +33 (0)1 47 11 15 68
francois.drupt@curie.net

DUBRULLE Marie-Pierre

GIS IBISA
147, rue de l'Université
75338 PARIS Cedex 07 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 75 91 44
mdubrulle@ibisa.net

DUJARDIN Hélène

Celeza
28, rue Jules Vallès
91000 EVRY – FRANCE
helene@celeza.ch

DUMITRESCU Adriana-Mariana

Laboratoire de cytométrie en flux
Institute Clinique Fundeni
Soseaua Fundeni nr. 258
022328 BUCAREST – ROUMANIE
Tél. : +40 21 313 1015
amdumitrescu@yahoo.com

DUPERRAY Christophe

MRI - Cytométrie - IRB
Hôpital Saint-Elou
80, avenue Augustin Fliche
34295 MONTPELLIER Cedex 5 – FRANCE
christophe.duperray@inserm.fr

DUPLAN-ECHE Valérie

U1043 - CPTP
Inserm - UMR 1043
Bâtiment B - CHU Purpan
31024 TOULOUSE Cedex 3 – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 62 74 83 90
Fax : +33 (0)5 62 74 45 58
valerie.duplan@inserm.fr

DURAND Isabelle

Plate-forme immunotoring
Centre Léon Bérard
28, rue Laënnec
69373 LYON Cedex 08 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 26 55 67 14
durandi@lyon.fnclcc.fr

DUSSURGEY Sébastien

Plateau de cytométrie
Inserm Lyon Gerland
21, avenue Tony Garnier
69007 LYON Cedex 07 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 37 28 23 32
Fax : +33 (0)4 37 28 76 57
sebastien.dussurgey@inserm.fr

DUTERTRE Charles-Antoine

Département immunologie-hématologie
Inserm 1016
27, rue du faubourg Saint-Jacques
Bâtiment Gustave Roussy - 8e étage
75014 PARIS – FRANCE
charles-antoine.dutertre@inserm.fr

DUYSSENS Guerin

Histologie Humaine
Université de Liège
Avenue de l'hôpital 1
4000 LIÈGE – BELGIQUE
Tél. : +32 4 366 43 29
Fax : +32 4 366 43 21
guerin.duysens@ulg.ac.be

ELBIM Carole

Inserm UMR-S 945
Hôpital de la Pitié-Salpêtrière
83, boulevard de l'Hôpital
75013 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 17 74 88
carole.elbim@upmc.fr

FARADJI Floria

Biologie du développement
UPMC / CNRS UMR 76220
9, quai Saint-Bernard
75005 PARIS – FRANCE
airlofe@gmail.com

FAUSSAT Anne-Marie

IFR 65
UPMC
27, rue de Chaligny
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 01 13 68
anne-marie.faussat@upmc.fr

FAYARD Caroline

Laboratoire d'hématologie
CHU de Saint-Etienne
Avenue Albert Raimond
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 77 82 83 63
Fax : +33 (0)4 77 82 86 99
caroline.fayard@chu-st-etienne.fr

FEGER Frédéric

Laboratoire d'hématologie
Hôpital Saint-Antoine
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75012 PARIS Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 28 31 27
Fax : +33 (0)1 49 28 30 46
frederic.feger@sat.aphp.fr

FEUILLARD Jean

Laboratoire d'Hématologie
CHU de Limoges, Hôpital Dupuytren
2, avenue du Dr Martin Luther King
87047 LIMOGES – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 55 05 67 40
jean.feuard@unilim.fr

FLOCH Aurelie

Institut Jacques Monod
Bâtiment Buffon - Labo 342b
15, rue Hélène Brion
75025 PARIS Cedex 13 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 57 27 80 62
floch.aurelie@ijm.univ-paris-diderot.fr

FOGUENNE Jacques

CHU Liège
Avenue de l'Hôpital, 1
4000 LIÈGE – BELGIQUE
Tél. : +32 4 366 82 60
Fax : +32 4 366 73 94
jacques.foguenne@chu.ulg.ac.be

FOISSAUD Vincent

Laboratoire de biologie
Hôpital d'Instruction des Armées Percy
101, avenue Henri Barbusse
92141 CLAMART – FRANCE
vincent.foissaud@santarm.fr

FONTAINE-AUPART Marie-Pierre

ISMO
CNRS
Université Paris Sud
91405 ORSAY – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 69 15 82 44
marie-pierre.fontaine-aupart@u-psud.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

FONTENAY Michaela

Institut Cochin
22, rue Méchain
75014 PARIS – FRANCE
fontenay@cochin.inserm.fr

FOSSAT Chantal

Laboratoire d'hématologie
CHU de la Timone
Rue Saint Pierre
13385 MARSEILLE Cedex 5 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 38 63 75
Fax : +33 (0)4 91 94 23 32
chantal.fossat@ap-hm.fr

FOURNIER Nathalie

LFB Biotechnologies
84, rue du Docteur Yersin
59120 LOOS – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 28 55 06 73
fourniem@lfb.fr

FRANGNE Nathalie

UMR 1332 BFP
IBVM, INRA Centre Bordeaux
71, avenue Edouard Bourlaux
BP 81
33883 VILLENAVE-D'ORNON Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 57 12 25 58
Fax : +33 (0)5 57 12 25 41
nathalie.frangne@bordeaux.inra.fr

FRENZEL Monika

CEA
18, route du Panorama
92265 FONTENAY-AUX-ROSES – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 46 54 83 52
monika.frenzel@cea.fr

FREYBURGER Ludovic

Médecine préventive
Vetagro-Sup
Aile 1, étage 1, bureau 114
1, avenue Bourgelat
69280 MARCY-L'ÉTOILE – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 43 96 70 70
Fax : +33 (0)1 43 96 72 99
lfreyburger@vet-alfort.fr

FRIBOURG Caroline

Clinisciences
183, avenue Georges Clémenceau
92000 NANTERRE – FRANCE
Tél. : +33 (0)9 77 40 09 09
Fax : +33 (0)9 77 40 10 11
c.fribourg@clinisciences.com

FUSEAU Pascal

Laboratoire immunologie – virologie
CHU Fort de France
BP 632
97261 FORT DE FRANCE, MARTINIQUE
Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 96 55 24 24
pascal.fuseau@chu-fortdefrance.fr

GALATEANU Bianca

Biochimie et biologie moléculaire
Université de Bucarest
M.Koglaniceanu 36-46, Sect 5
050107 BUCAREST – ROMANIA
Tél. : +40 74 53 59 926
bianca.galateanu@gmail.com

GARNACHE Francine

Laboratoire de cytologie
EFS BFC
1, boulevard Alexandre Fleming
BP 1937
25020 BESANÇON Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 81 61 56 15
Fax : +33 (0)3 81 61 56 45
francine.garnache@efs.sante.fr

GENDRON Marie-Claude

37, rue Camille Desmoulins
94230 CACHAN – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 79 56 81 64
mcgendron@hotmail.fr

GENG Jing

Danone Research
Rd 128
91767 PALAISEAU – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 69 35 76 72
jing.geng@danone.com

GENTY Vincent

Amarok Biotechnologies
Hôtel de la Technopole
1, rue des Mauriers
35400 SAINT-MALO – FRANCE
v.genty@amarokbiotech.com

GIULIANI Massimo

CTSA
Hôpital Percy
BP 141
92141 CLAMART – FRANCE
giulianimas@hotmail.com

GOBLET Michel

Laboratoire de biologie clinique
CH de l'Ardenne
Avenue d'Houffalize, 35
B-6800 LIBRAMONT-CHEVIGNY – BELGIQUE
Tél. : +32 61 23 85 43
Fax : +32 61 23 85 31
michel.goblet@cha.be

GOFFLOT Jean-Marc

BD Biosciences
11, rue Aristide Bergès
38800 LE PONT-DE-CLAIX – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 76 68 32 98
Fax : +33 (0)4 76 68 35 44
jean-marc_gofflot@europe.bd.com

GONDOIS REY Françoise

Inserm
27, boulevard Leï Roure
13009 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 75 84 21
Fax : +33 (0)4 91 26 03 64
francoise.gondois-rey@inserm.fr

GOROMBEI Petra

Institut Universitaire d'Hématologie
Paris Diderot - Paris 7
1, avenue Claude Vellefaux
75010 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 72 40 18
petra.gorombei@gmail.com

GOSSET David

UPR 4301 CNRS
Rue Charles Sadron
45071 ORLÉANS – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 38 25 76 67
Fax : +33 (0)2 38 63 15 17
david.gosset@cnrs-orleans.fr

GRANT Nancy

CNRS UPR 3212 INCI
5, rue Blaise Pascal
67084 STRASBOURG – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 88 45 67 14
Fax : +33 (0)3 88 60 16 64
ngrant@unistra.fr

GUENOUNOU Sabrina

CEA
18 route du Panorama
92260 FONTENAY-AUX-ROSES – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 46 54 94 77
Fax : +33 (0)1 46 54 77 26
sabrina.guenounou@cea.fr

GUERIN Coralie

Centre de Recherche Cardiovasculaire
56, rue Leblanc
75015 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 98 80 40
coralie.guerin@inserm.fr

GUERIN Estelle

Laboratoire d'hématologie
CHU Dupuytren
2, avenue Martin Luther-King
87042 LIMOGES Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 55 05 55 55
estelle.guerin@chu-limoges.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

GUÉRIN-EL KHOUROUJ Valérie

Laboratoire d'immunologie
Hôpital Robert Debré
48, boulevard Sérurier
75019 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 03 53 05
Fax : +33 (0)1 40 03 47 76
valerie.guerin@rdp.aphp.fr

GUETTE Frédérique

Unité exploratoire
Sanofi-aventis R&D
195, route d'Espagne
BP 13669
31036 TOULOUSE – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 34 63 40 30
Fax : +33 (0)5 34 63 28 71
frederique.guette@sanofi.com

GUGUIN Aurelie

IMRB U955 - Faculté de Médecine
8, rue du Général Sarrail
94010 CRETEIL – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 81 36 03
aurelie.guguin@inserm.fr

GUILMOT Aline

Université Libre de Bruxelles
Route de Lennick, 808
CP 616
1070 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 2 555 6131
Fax : +32 2 555 6128
aguilmot@ulb.ac.be

GUY Julien

Hématologie biologique - PTB
CHU Dijon
2, rue Angélique Ducoudray
21000 DIJON – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 80 29 34 45
julien.guy@chu-dijon.fr

HADIFE Nader

UHP-Nancy
CU du Charmois
BATC, C224
1, allée du Charmois
54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY – FRANCE
naderhadife@hotmail.fr

HAMMANN Arlette

Plate-forme de cytométrie
Inserm
Faculté de Médecine
7, boulevard Jeanne d'Arc
21000 DIJON – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 80 39 34 67
Fax : +33 (0)3 80 39 34 34
arlettehammann@yahoo.fr

HARRATH Raffik

Institut Supérieure de Biotechnologie
Faculté de Pharmacie de Monastir
5000 MONASTIR – TUNISIE
Tél. : 216 73 461 000
Fax : 216 73 461 830
r_harrath@yahoo.fr

HARRIVEL Véronique

Laboratoire d'hématologie
CHU Amiens Sud
Avenue Laennec
80480 SALOUEL Cedex 1 – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 22 45 04 07
harrivel.veronique@chu-amiens.fr

HELLEY Dominique

Hématologie biologique
HEGP
20, rue Leblanc
75015 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 56 09 39 05
Fax : +33 (0)1 56 09 33 93
dominique.helley@egp.aphp.fr

HENRY Adeline

IMRB U955 - Faculté de Médecine
8, rue du Général Sarrail
94010 CRETEIL – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 81 36 03
adeline.henry@inserm.fr

HERZOG Etienne

UMR 5297
IINS CNRS - Université de Bordeaux
146, rue Léo-Saignat
33077 BORDEAUX Cedex 05 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 27 61 23
Fax : +33 (0)1 44 27 61 59
etienne.herzog@snv.jussieu.fr

HOUGARDY Nicolas

Laboratoire de cytométrie
Cliniques du Sud Luxembourg
137, rue des Déportés
6700 ARLON – BELGIQUE
Tél. : +32 63 23 16 48
nhougardy@clinsudlux.be

HOUSSET Chantal

IFR 65 & UMR_S 938
UPMC
Site Saint-Antoine
75571 PARIS Cedex 12 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 01 13 59
Fax : +33 (0)1 40 01 13 52
chantal.houssel@inserm.fr

HUSSON Bernard

Laboratoire d'hématologie - Unité CMF
Hôpital de Jolimont
Rue Ferrer, 159
B-7100 HAINE-ST-PAUL – BELGIQUE
Tél. : +32 64 23 41 03
Fax : +32 64 23 38 47
bernard.husson@swing.be

IDZIOREK Thierry

Inserm U837 - IFR 114
Bâtiment IRCL
1, place de Verdun
59045 LILLE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 20 16 92 28
Fax : +33 (0)3 20 16 92 29
thierry.idziorek@inserm.fr

IZEDDIN Ignacio

Ecole Normale Supérieure
46, rue d'Ulm
75005 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 32 33 99
lzeddin@lkb.ens.fr

JACOB Marie-Christine

Immunologie
CHU Grenoble
Boulevard de la Chantourne
IBP
38700 LA TRONCHE Cedex 9 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 76 76 54 16
mcjacob@chu-grenoble.fr

JADIN Vincent

Business Unit Cellomics
Analis
Rue de Néverlée 11
5020 SUARLÉE – BELGIQUE
Tél. : +32 81 25 50 50
vjn@analis.be

JOLOIS Olivier

Histologie humaine - CRPP
Université de Liège
Avenue de l'hôpital 1
B-4000 LIÈGE – BELGIQUE
Tél. : +32 4 366 43 29
Fax : +32 4 366 43 21
ojolois@ulg.ac.be

JOUY Nathalie

Service commun de cytométrie
IMPRT IFR 114 - IRCL
Place de Verdun
59045 LILLE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 20 16 92 16
Fax : +33 (0)3 20 16 92 29
nathalie.jouy@inserm.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

JUDICONE Coralie

BioCytex
140, chemin de l'Armée d'Afrique
13010 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 96 12 20 40
coralie.judicone@biocytex.fr

JUFFROY Olivier

Biologie cellulaire et immunologie
Ozyme
B.P. 268
78053 SAINT QUENTIN EN YVELINES –
FRANCE
Tél. : +33 (0)1 34 60 24 24
Fax : +33 (0)1 34 60 92 12
ojuffroy@ozyme.fr

JUND-RIEGERT Jennifer

Silabe
Fort Foch
67207 NIEDERHAUSBERGEN – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 88 56 78 55
jennifer.jund@silabe.com

KAHN Edmond

Laboratoire d'imagerie fonctionnelle
Inserm U678
CHU Pitié-Salpêtrière
91, boulevard de l'Hôpital
75634 PARIS Cedex 13 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 82 84 43
Fax : +33 (0)1 53 82 84 48
kahn@imed.jussieu.fr

KERRELS Véronique

Laboratoire d'hématologie
CHU Saint-Pierre
290, rue Haute
B-1000 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 2 535 40 20
Fax : +32 2 535 46 56
veronique_kerrels@stpierre-bru.be

KOESTERS Robert

UPMC / Hôpital Tenon
4, rue de la Chine
75020 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 56 01 70 69
robert.koesters@upmc.fr

KORNREICH Anne

CHU Ambroise Pare
Boulevard du President Kennedy, 2
7000 MONS – BELGIQUE
Tél. : +32 65 39 27 19
anne.kornreich@hap.be

L'FAQIHI-OLIVE Fatima-Ezzahra

Plateau technique cytométrie
Inserm - UMR 1043 - CPTP
CHU Purpan, bâtiment B
BP 3028
31024 TOULOUSE Cedex 3 – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 62 74 83 90
Fax : +33 (0)5 62 74 45 58
fatima.lfaqihi@inserm.fr

LAHAYE Carine

BD Biosciences Benelux
Erembodegem-Dorp, 86
B-9320 EREMBODEGEM – BELGIQUE
Tél. : 0032 053 720 600
Fax : +32 53 720 220
carine_lahaye@europe.bd.com

LAMBERT Claude

Laboratoire d'immunologie
Pôle de Biologie-Pathologie
Hôpital Nord
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 77 12 05 13
Fax : +33 (0)4 77 12 05 52
claudelambert@chu-st-etienne.fr

LAPLACE-BUILHÉ Corinne

Imagerie cellulaire & cytométrie en flux
Institut de Cancérologie Gustave Roussy
114, rue Edouard Vaillant
94805 VILLEJUIF Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 11 66 72
corinne.laplace@igr.fr

LARCIN Sandrine

Hôpital de Jolimont
Rue Ferrer, 159
7100 HAINE-ST-PAUL – BELGIQUE
gautier.detry@entitejolimontoise.be

LATAILLADE Jean-Jacques

Recherches et thérapies cellulaires
CTS des Armées
BP 410
92141 CLAMART – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 41 46 72 60
Fax : +33 (0)1 46 38 82 87
jjlataillade@gmail.com

LATGER-CANNARD Véronique

Service d'hématologie biologique
CHU Nancy-Brabois
Avenue du Morvan
54511 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex –
FRANCE
Tél. : +33 (0)3 83 15 37 64
Fax : +33 (0)3 83 15 37 89
v.cannard@chu-nancy.fr

LAUTIER Regine

Hématologie biologique
AP-HP Saint-Antoine
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 28 22 74
regine.lautier@worldonline.fr

LE BIGOT Guillaume

Beckman Coulter
Paris Nord II - BP 50359 - Villepinte
33, rue des Vanesses
95942 ROISSY CDG Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 90 90 00
Fax : +33 (0)1 49 90 90 10
glebigot@beckman.com

LE TREUT Thérèse

Laboratoire d'hématologie
Hôpital Nord
Chemin des Bourrely
13015 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 96 43 51
Fax : +33 (0)4 91 96 50 53
thereselet@voila.fr

LECLERCQ Fabrice

Unité de recherches
LFB Biotechnologies
84, rue du Docteur Yersin
59120 LOOS – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 28 55 06 62
Fax : +33 (0)3 28 55 51 33
leclercq@lfb.fr

LÉCLUSE Yann

Plate-forme d'imagerie cellulaire
Institut Gustave Roussy
114, rue Edouard Vaillant
94805 VILLEJUIF – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 42 11 61 68
Fax : +33 (0)1 42 11 66 30
ylecluse@igr.fr

LECOEUR Hervé

Laboratoire d'immunologie et de parasitisme
Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux
75015 PARIS Cedex 15 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 45 68 86 70
Fax : +33 (0)1 45 68 83 32
helecoeur@pasteur.fr

LEES Olivier

Laboratoire d'immunopathologie
CHU Charles Nicolle
1, rue de Germont
76031 ROUEN Cedex – FRANCE
olivier.lees@chu-rouen.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

LEGRAND Olivier

Hôpital Saint-Antoine, APHP
184, faubourg Saint-Antoine
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 28 34 39
ollivier.legrand@sat.aphp.fr

LEMAIRE Isabelle

Laboratoire d'hématologie
CHSF
Hopital Gilles de Corbeil
59, boulevard Henri Durand
91108 CORBEIL ESSONNES – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 60 90 30 70
Fax : +33 (0)1 60 90 31 58
Isabelle.Lemaire@ch-sud-francilien.fr

LEMOINE Bruno

Horiba Médical
Parc Euromédecine
Rue du Caducée
34184 MONTPELLIER Cedex 04 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 67 14 16 39
bruno.lemoine@horiba.com

LENORMAND Bernard

Laboratoire d'hématologie
CHU Charles Nicolle
1, rue de Germont
76031 ROUEN Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 32 88 89 90
Fax : +33 (0)2 32 88 83 66
bernard.lenormand@chu-rouen.fr

LEPELLEY Pascale

Centre de Biologie Pathologie
CHU Lille
2, avenue Oscar Lambret
59037 LILLE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 20 44 48 12
Fax : +33 (0)3 20 44 69 89
plepelley@chru-lille.fr

LESCOT Yacenia

StemCell Technologies
Miniparc Polytec
60, rue des Berges
38000 GRENOBLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 76 04 75 30
yacenia.lescot@stemcell.com

LEVALLOIS Mylene

CHRU
Formation Continue
1, place de l'Hôpital
67091 STRASBOURG – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 88 11 57 78
Fax : +33 (0)3 88 11 58 20
jeannille.maetz@chru-strasbourg.fr

LIEUBEAU Blandine

UMR-A 707/ONIRIS/Université de Nantes
ENV, Agroalimentaire et de l'Alimentation
Site de la Chantrerie
BP 40706
44307 NANTES Cedex 03 – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 40 68 77 18
blandine.lieubeau@oniris-nantes.fr

LIVET Jean

Développement des circuits neuronaux
Institut de la Vision
17, rue Moreau
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 46 25 18
jean.livet@inserm.fr

LOOSEN Claire

Laboratoire d'hématologie
UCL Mont-Godinne
1, avenue Dr Gaston Therasse
5530 YVOIR – BELGIQUE
Tél. : +32 81 42 32 43
Fax : +32 81 42 32 04
loosen_claire@hotmail.com

LORENTZ Catherine

CHRU
Formation Continue
1, place de l'Hôpital
67091 STRASBOURG – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 88 11 57 78
Fax : +33 (0)3 88 11 58 20
jeannille.maetz@chru-strasbourg.fr

LUCAS Mathias

AbD Serotec
MorphoSys Add GmbH
Münsterstraate 306
D40470 DUSSELDORF – ALLEMAGNE
Tél. : +211 23 95 6435
Fax : +211 23 95 6499
mathias.lucas@abdserotec.com

LUNDEEN Berent

Institut Universitaire d'Hématologie
Paris Diderot - Paris 7
1, avenue Claude Vellefaux
75010 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 72 40 18
blunde1@gmail.com

MACHEZ Emeline

Service de cytométrie
IRCL - IFR 114
Place de Verdun
59045 LILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 20 16 92 16
Fax : +33 (0)3 20 16 92 29
emeline.machez@univ-lille2.fr

MAGON Jean

Miltenyi Biotec
10, rue Mercoeur
75011 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 56 98 16 16
Fax : +33 (0)1 56 98 16 17
jean@miltenyibiotec.fr

MAIER Caroline

BD Biosciences
11, rue Aristide Berges
38800 LE PONT-DE-CLAIX – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 76 68 32 98
caroline_maier@europe.bd.com

MAILLY Philippe

Inserm UMRS 952, CNRS UMR 7224
Université Pierre et Marie Curie
7-9, quai Saint Bernard
Bât A, B
75005 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 27 35 78
philippe.mailly@snv.jussieu.fr

MAQUIN Jean-pierre

Life Science Research - Cellomics
Thermo Scientific
Perbi Science France SAS
BP 5
62117 BREBIÈRES – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 46 66 01 15
jean-pierre.maquin@thermofisher.com

MARÉCHAL Fabrice

Services généraux
Généthon
1 bis, rue de l'Internationale
91002 EVRY Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 69 47 28 28
marechal@genethon.fr

MARIE Jean-Pierre

Département d'hématologie
Hôpital Saint-Antoine / UPMC
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75571 PARIS CEDEX 12 Cedex 01 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 28 34 38
Fax : +33 (0)1 42 34 88 43
jean-pierre.marie@sat.aphp.fr

MARIN Stanislas

Fluidigm
stanislas.marin@fluidigm.com

MASSIN Frédéric

Service d'immunologie
CHU Nancy
29, av. du maréchal de Lattre de Tassigny
54035 NANCY – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 83 15 42 92
Fax : +33 (0)3 83 15 76 60
f.massin@chu-nancy.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

MATHUIS Philip

Ovizio Imaging System
Rue Engelandstraat 555
1180 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 479 43 43 99
philip.mathuis@ovizio.com

MAX Stéphanie

CHU Liège
Avenue de l'Hôpital, 1
4000 LIÈGE (SART-TILMAN) – BELGIQUE
Tél. : +32 4 3668260
Fax : +32 4 3667394
stephmax26@gmail.com

MAYOL Jean-François

Département biologie des rayonnements
IRBA - Antenne La Tronche
24, avenue des Maquis du Grésivaudan
BP 87
38702 LA TRONCHE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 76 63 97 54
Fax : +33 (0)4 76 63 69 22
mayol@crssa.net

MECONI Sonia

Sartorius Stedim France
ZI Les Palluds
Avenue de Jouques, CS71058
13781 AUBAGNE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 42 84 56 00
sonia.meconi@sartorius-stedim.com

MELLALI Sarah

Université Djillali Liabes
Cité 244 logements
5 juillet, sfisef
22002 SIDI BEL ABBES – ALGÉRIE
Tél. : +213 790 703 803
sara.mellali@yahoo.fr

MENTZ Frank

Medibio
5, boulevard du Chinchon
45200 MONTARGIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 38 95 08 90
p.jouhaud@labm-medibio.fr

MERCIER-BATAILLE Delphine

Laboratoire d'hématologie
APHM - Hôpital Nord
Chemin de Bourrellys
13015 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 96 88 02
delphine.mercier@ap-hm.fr

MEYER Evelyne

Ghent Université
Salisbury LN133
B-9820 MERELBEKE – BELGIQUE
Tél. : +32 9264 73 29
Fax : +32 9264 74 97
evelyne.meyer@ugent.be

MOHAMADI Latifa

Université Djillali Liabes
Citen 1500 logements
Bâtiment 'j2' n°1167
22002 SIDI BEL ABBES – ALGÉRIE
Tél. : +213 555 943 571
mohamadi.latifa@yahoo.fr

MOHAMMEDI Mekkia

Hôpital
Rue Principale
42007 GOURAYA WILLAYA DE TIPIPAZA – ALGÉRIE
Tél. : +213 24 45 28 65
mkmohammedilive@live.fr

MONTAGNON Julien

Hématologie
PTB CHU Dijon
2, rue Angélique Ducoudray
21000 DIJON – FRANCE
julien.montagnon@chu-dijon.fr

MOUTHON Marc-André

DSV/iRCM/SCSR
CEA FAR
18, route du Panorama
92265 FONTENAY-AUX-ROSES – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 46 54 94 61
marc-andre.mouthon@cea.fr

MULLIER Francois

CHU Mont-Godinne
1, avenue Gaston Therasse
5530 YVOIR – BELGIQUE
mullierfrancois@gmail.com

MUNIER Annie

Service imagerie et cytométrie en flux
UPMC Biologie Intégrative - IFR 83
7-9, quai Saint-Bernard
Bâtiment B - 7e étage - Case 25
75252 PARIS Cedex 05 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 27 20 14
Fax : +33 (0)1 44 27 22 91
annie.munier@snv.jussieu.fr

N'GUYEN-DE BERON Marie

Plate-forme de cytométrie
Institut Pasteur
25, rue du Docteur Roux
75724 PARIS Cedex 15 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 45 68 85 38
marie.nguyen-de-bernon@pasteur.fr

NAGERL Valentin

CNRS - Université Victor Segalen Bordeaux 2
146, rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 57 57 10 97
valentin.nagerl@u-bordeaux2.fr

OKAMBA Patricia

CHR Metz-Thionville
20, rue Drogon
57000 METZ – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 87 55 38 06
p.okamba@chr-metz-thionville.fr

ONGENAERT Maté

Université de Gent
De Pintelaan 185,
9000 GHENT – BELGIQUE
Tél. : +32 93 32 39 46
mate.ongenaert@ugent.be

ORMENESE Sandra

Cytométrie en flux et imagerie cellulaire
GIGA ULG
Avenue de l'Hôpital, 1
B23
4000 LIÈGE (SART-TILMAN) – BELGIQUE
Tél. : +32 43 66 25 79
Fax : +32 43 66 29 19
sandra.ormenese@ulg.ac.be

OUKID Salima

Hématologie
CAC Zabana Blida
09000 BLIDA – ALGÉRIE
sali_oukid@yahoo.fr

PACHECO Antoine

Département marketing
Beckman Coulter
Paris Nord II
33, rue des Vanesses - BP 50359 - Villepinte
95942 ROISSY CDG Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 90 91 44
Fax : +33 (0)1 49 90 91 60
apacheco@beckman.com

PAPA Stefano

Cytométrie
Université Carlo Bo
Via Saffi 2
61029 URBINO – ITALY
Tél. : +39 07 22 30 42 82
Fax : +39 07 22 30 42 40
stefano.papa@uniurb.it

PASSE-COUTRIN Wilfried

Bioanalyse biomarqueur
Sanofi
3, digue d'Alfortville
94140 ALFORTVILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 58 93 27 39
wilfried.passe-coutrin@sanofi-aventis.com

PASTORET Cédric

Laboratoire d'hématologie
CHU Pontchaillou
2, rue Henri Le Guilloux
35000 RENNES – FRANCE
cedricpastoret@yahoo.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

PEFFAULT DE LATOUR Régis

Alexion Pharma
56, avenue Hoche
75008 PARIS – FRANCE

PELLÉ Olivier

Inserm U768
Hopital Necker
149, rue de Sèvres
Bâtiment Kirmisson
75015 PARIS Cedex 13 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 49 50 73
Fax : +33 (0)1 42 73 06 40
olivier.pelle@inserm.fr

PELLICIER Françoise

Laboratoire de biologie cutanée
Parfums Christian Dior
185, avenue de Verdun
45804 SAINT-JEAN-DE-BRAYE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 38 60 33 38
Fax : +33 (0)2 38 60 31 17
fpellicier@research.lvmh-pc.com

PELUSO Jean

Université de Strasbourg
74, route du Rhin - BP 60024
67401 ILLKIRCH Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 90 24 42 54
Fax : +33 (0)3 90 24 43 12
jpeluso@unistra.fr

PERES Michael

Laboratoire d'immunologie
CHU Toulouse Rangueil
1, avenue du professeur Jean Poulhes
31059 TOULOUSE – FRANCE
michael.peres14@gmail.com

PEREZ Philippe

L'Oréal
1, avenue Eugène Schueller
93600 AULNAY-SOUS-BOIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 48 68 96 73
pperez@rd.loreal.com

PERNELLE Jean-Jacques

Microbiologie
Cemagref
1, rue Pierre-Gilles de Gennes
CS 10030
92761 ANTONY Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 96 60 93
Fax : +33 (0)1 40 96 61 99
jean-jacques.pernelle@cemagref.fr

PETIT Patrice

UMR 8104
Institut Cochin
123, boulevard du Port Royal
75014 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 10 43 73
patrice.petit@inserm.fr

PICOT Julien

Laboratoire de cytométrie
GIP - INTS
6, rue Alexandre Cabanel
75015 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 49 30 47
Fax : +33 (0)1 43 06 50 19
jpicot@ints.fr

PIERANI Alessandra

CNRS UMR 7592 Université Paris Diderot
15, rue Hélène Brion
75013 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 57 27 81 25
pierani.alessandra@ijm.univ-paris-diderot.fr

PIERRARD Jean-Louis

Cytométrie et immunologie
Analisis SA
Rue de Néverlée, 11
5020 SUARLÉE - NAMUR – BELGIQUE
Tél. : +32 81 255 049
Fax : +32 81 230 779
jlp@analisis.be

PIOLOT Tristan

Institut Curie - CNRS
11-13, rue Pierre et Marie Curie
75005 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 56 24 65 65
tristan.piolot@curie.fr

PLANÇON Sébastien

Labo inflammation - LSRU
Université du Luxembourg
162a, avenue de la Faïencerie
Bâtiment des sciences BS-1.21
L-1511 LUXEMBOURG – LUXEMBOURG
Tél. : +46 66 44 64 50
Fax : +46 66 44 64 30
sebastien.plancon@uni.lu

PONCELET Philippe

R&T
BioCytex
140, chemin de l'Armée de l'Afrique
13010 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 96 12 20 43
Fax : +33 (0)4 91 47 24 71
philippe.poncelet@biocytex.fr

PROROT Audrey

ENSIL - Université de Limoges
Parc Ester Technopole
16, rue Atlantis
87068 LIMOGES Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 55 42 36 92
prorot@ensil.unilim.fr

QUARANTA Muriel

LBCMCP - FRBT
118, route de Narbonne
Bâtiment 4R3 b1
31062 TOULOUSE Cedex 9 – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 61 55 69 14
Fax : +33 (0)5 61 55 81 09
quaranta@cict.fr

RAYNAUD Cécile

Institut de Biologie des Plantes
UMR 8618 Université Paris-XI CNRS
Bâtiment 630
91405 ORSAY – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 69 15 33 50
cecile.raynaud@u-psud.fr

RENDON Alvaro

Institut de la Vision
UMRS_968 Inserm / UPMC
17, rue Moreau
75012 PARIS Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 46 25 65
alvaro.rendon@inserm.fr

REQUIRAND Guilhem

IRB
CHU Montpellier
80, avenue Augustin Fliche
34295 MONTPELLIER – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 67 33 04 90
guilhem.requirand@inserm.fr

REYES Jean

Mérial
254, rue Marcel Mérieux
69007 LYON – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 72 72 30 00
Fax : +33 (0)4 72 72 32 04
jean.reyes@merial.com

RIANCHO Luisa

Institut de la Vision
17, rue Moreau
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 53 46 25 69
luisa.riancha@inserm.fr

RIGOLLET Lauren

Laboratoire d'hématologie
CHU Saint-Etienne
Pavillon de Biologie - Hôpital Nord
Avenue Albert Raimond
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 77 82 83 63
Fax : +33 (0)4 77 82 86 99
lauren.rigollet@chu-st-etienne.fr

RINCHEVAL Vincent

Université de Versailles / St Quentin
45, avenue des Etats-unis
78000 VERSAILLES – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 39 25 36 59
vincent.rincheval@uvsq.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

ROBERT Stéphane

UMR S-608
Faculté de Pharmacie
27, boulevard Jean Moulin
13005 MARSEILLE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 91 83 56 01
Fax : +33 (0)4 91 83 56 02
stephane.robert@univmed.fr

ROBILLARD Nelly

Laboratoire d'hématologie
CHU - Institut de Biologie
9, quai Moncoussu
44093 NANTES Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 40 08 40 54
Fax : +33 (0)2 40 08 40 50
nelly.robillard@chu-nantes.fr

ROMAN Viviana

Institute of Virology
285, Mihai Bravu avenue
030304 BUCAREST – ROUMANIE
Tél. : +40 21 324 1471
Fax : +40 21 324 1471
rviviana30@yahoo.com

RONOT Xavier

Laboratoire EPHE CaCyS - AGIM
Université Joseph Fourier
Pavillon Taillefer
38706 LA TRONCHE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 56 52 00 48
Fax : +33 (0)4 76 54 94 14
xavier.ronot@ujf-grenoble.fr

ROSSO Marie

Merck Millipore
BP 307
78054 SAINT QUENTIN EN YVELINES Cedex
– FRANCE
Tél. : +33 (0)8 25 04 56 45
Fax : +33 (0)4 72 41 81 55
marie.rosso@merckgroup.com

ROUSSEL Mikaël

Laboratoire d'hématologie
CHU Pontchaillou
2, rue Henri Le Guilloux
35033 RENNES Cedex 9 – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 99 28 91 42
mikael.rousseau@chu-rennes.fr

ROYNARD Patricia

Service biologie tumorale
Hôpital Tenon AP HP
5, rue de la Chine
75020 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 56 01 78 52
Fax : +33 (0)1 56 01 76 27
patricia.roynard@tnn.aphp.fr

SAAB Léa

Université de Strasbourg
74, route du Rhin
67401 ILLKIRCH – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 90 24 42 54
lea.saab@etu.unistra.fr

SABATINI Christine

AFSSAPS
143-147, boulevard Anatole France
93285 SAINT-DENIS Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 55 87 42 12
Fax : +33 (0)1 55 87 42 02
christine.sabatini@afssaps.sante.fr

SANATINE Peggy

Laboratoire imagerie - cytométrie
Généthon
1, bis rue de l'International
BP 60
91000 EVRY – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 69 47 28 28
psanatine@genethon.fr

SANGAR Fatiha

Inserm UPMC UMR_S 938
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75012 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 28 46 29
fatiha.sangar@inserm.fr

SAUCE Delphine

Inserm UMRS-945
Faculté de Médecine, pièce 607
91, boulevard de l'Hôpital
75013 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 77 81 84
delphine.sauce@upmc.fr

SAUSSOY Pascale

Hématologie
Cliniques Universitaires Saint-Luc
Tour Franklin (-3 Sud)
10, avenue Hippocrate
B-1200 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 2 764 67 80
Fax : +32 2 762 69 31
pascale.saussoy@uclouvain.be

SCHAAF Nicole

Laboratoire d'hématologie
CHU
Domaine Universitaire Sart Tilman
Bâtiment B 35
4000 LIÈGE – BELGIQUE
Fax : +32 4 366 73 94
nicole.schaaf@chu.ulg.ac.be

SCHANDENE Liliane

Clinique Immunobiologie
Hôpital Erasme
808, rue Lennik
B-1070 BRUXELLES – BELGIQUE
Tél. : +32 2 555 3737
Fax : +32 2 555 4499
lschande@ulb.ac.be

SEGUY Franck

Horiba ABX
Parc Euromédecine
Rue du Caducée - BP 7290
34184 MONTPELLIER – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 67 14 15 16
Fax : +33 (0)4 67 14 15 17
franck.seguy@horiba.com

SELLEM Eliaou

UNCEIA
13, rue Jouet
94700 MAISONS-ALFORT – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 43 53 51 58
Fax : +33 (0)1 43 53 51 01
eli.sellem@unceia.fr

SELLIN Caroline

Bioprocess R&D, Upstream
Sanofi Pasteur
1541, avenue Marcel Mérieux
69280 MARCY-L'ÉTOILE – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 37 37 53 61
caroline.sellin@sanofipasteur.com

SENCE Remy

Biospace Lab
10, rue Mercoeur
75011 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 55 25 60 60
rsence@biospacelab.com

SEPERS Jean-Pierre

BD Biosciences
Erembodegem-dorp, 86
B-9320 EREMBODEGEM – BELGIQUE
Tél. : +32 53 720 653
jean-pierre_sepers@europe.bd.com

SEQUERIA Anabelle

Plate-forme de cytométrie
Université de Bourgogne
Faculté de Médecine
7, boulevard Jeanne d'Arc
21000 DIJON – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 80 39 34 67
Fax : +33 (0)3 80 39 34 34
anabelle.legrand@u-bourgogne.fr



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

SILVESTRE David

Institut Curie
26, rue d'Ulm
75248 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 56 24 66 12
Fax : +33 (0)1 56 24 66 74
david.silvestre@curie.fr

SIMONS Jacques

Coordination & prévention des risques
Inserm DR Paris 11
Hôpital Kremlin-Bicêtre
Bâtiment Claude Bernard
94276 LE KREMLIN-BICÊTRE Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 59 18 17
Fax : +33 (0)1 49 59 18 74
jacques.simons@inserm.fr

SLEIMAN Marwan

CRP-Santé - Luxembourg
84 Val Fleuri
1526 LUXEMBOURG – LUXEMBOURG
Tél. : +35 22 69 70 327
marwan.sleiman@crp-sante.lu

SOBCZAK-THÉPOT Joëlle

CNRS UMR 7622
UPMC
9, quai Saint-Bernard
Case 24
75005 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 27 22 95
Fax : +33 (0)1 44 27 22 15
Joelle.Sobczak_Thepot@upmc.fr

SOLLY Françoise

Laboratoire d'hématologie
CHU Saint-Etienne
Pavillon de Biologie - Hôpital Nord
Avenue Albert Raimond
42055 SAINT-ETIENNE Cedex 2 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 77 82 83 63
Fax : +33 (0)4 77 82 86 99
francoise.solly@chu-st-etienne.fr

STEPHAN Raafat

GIGA ULG
Avenue de l'Hôpital, 1
B34
4000 LIÈGE – BELGIQUE
Tél. : +32 43 66 25 79
Fax : +32 43 66 29 19
raafat.stephan@ulg.ac.be

STREIFF Clara

Attune Acoustic Focusing Cytometry & Flow
Solutio
Life Technologies
25, Avenue de la Baltique
91943 COURTABŒUF – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 69 59 85 85
Fax : +33 (0)1 69 59 85 00
clara.streiff@lifetech.com

SYLLA Naya

CEA
18, route du panorama
92265 FONTENAY-AUX-ROSES – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 46 54 87 38
Fax : +33 (0)1 46 54 77 26
naya.sylla@cea.fr

TAMBURINI Sabrina

Université de Trento (DICA)
Via Mesiano, 77
38050 TRENTO – ITALIE
Tél. : +39 04 61 28 3665
tamburini@science.unitn.it

TAQUET Nathalie

Inra
400, route de Chappes
06900 SOPHIA ANTIPOLIS Cedex – FRANCE
nathtaquet@free.fr

TARDITO Stefania

Marketing
Cobolt AB
Vretenvägen 13
SE-17154 SOLNA – SWEDEN
Tél. : +468 545 912 30
Fax : +468 545 912 31
hakan.karlsson@cobolt.se

TASSIGNON Joël

ImmuneHealth
Rue Adrienne Bolland 8/2
6041 GOSSELIES – BELGIQUE
Tél. : +32 713 785 00
s.scorcioni@biovallee.be

THOLLE Judith

Hôpital Robert Debré
48, boulevard Sérurier
75935 PARIS – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 40 03 57 80
veronique.mansuy@rdp.aphp.fr

TICCHIONI Michel

Laboratoire d'immunologie
Hôpital de l'Archet 1
Route de Saint Antoine de Ginestière
06202 NICE Cedex 3 – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 92 03 55 02
Fax : +33 (0)4 92 03 54 70
michel.ticchioni@unice.fr

TKACZUK Jean

Laboratoire d'hématologie
CHU Toulouse
1, avenue Jean Poulhes
TSA 50032
31059 TOULOUSE Cedex 9 – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 61 32 29 83
Fax : +33 (0)5 61 32 22 82
tkaczuk.j@chu-toulouse.fr

TRIBOUT-JOVER Pascale

Chronic Disorders
GlaxoSmithKline Biologicals
525, Cartier Ouest
H7V 3S8 LAVAL – FRANCE
Tél. : +1 450 978 7706
Fax : +1 450 978 6340
pascale.j.tribout-jover@gskbio.com

TRINQUAND Amélie

Hôpital Necker Enfants Malades
149, rue de Sèvres
75743 PARIS Cedex 15 – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 44 49 40 00
amelie.trinquand@nck.aphp.fr

URING-LAMBERT Béatrice

Immunologie cellulaire
Hôpital de Hautepierre
14, rue Pontonniers
67000 STRASBOURG Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)3 69 55 08 05
beatrice.lambert@chru-strasbourg.fr

VAGO Philippe

Cytogénétique
CHU Estaing
1, place Lucie Aubrac
63 000 CLERMONT-FERRAND Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 73 75 07 06
pvago@chu-clermontferrand.fr

VAN BOCKSTAELE Dirk

Clinical Trials Services
Esoterix BVBA
Generaal De Wittelaan L11 A2
B-2800 MECHELEN – BELGIQUE
Tél. : +32 15 342 111
Fax : +32 15 342 147
vanbockd@labcorp.com

VAN DE LOOSDRECHT Arjan

Cancer center
VU Institut of Cancer and Immunology
De Borlan 1117, 1081 HV
AMSTERDAM – PAYS-BAS
a.vandeloosdrecht@vumc.nl

VAN DENHAUTE Sofie

ZNA Stuivenberg
Lange Beeldkensstraat, 267
2060 ANTWERPEN – BELGIQUE
Tél. : +32 32 17 78 01
Fax : +32 32 17 78 12
sofie.vandenhoute@zna.be

VANHAUTEGHEM Donna

Ghent University
Salisbury LN133
B-9820 MERELBEKE – BELGIQUE
Tél. : +32 92 64 73 56
donna.vanhauteghem@ugent.be



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Participants

VASBIEN Myriam

CHR Citadelle Liège
Boulevard du 12° de Ligne
4000 LIÈGE – BELGIQUE
Tél. : +32 49 47 58 114
myriamvasbien@gmail.com

VAYSSIER-TAUSSAT Muriel

Inra/Enva/Anses
23, avenue du Général de Gaulle
94700 MAISONS-ALFORT – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 77 46 55
mvayssier@vet-alfort.fr

VELLIN Béatrice

TSU Infectious Diseases
Sanofi-Aventis R&D
195, route d'Espagne
31036 TOULOUSE – FRANCE
Tél. : +33 (0)5 34 63 33 17
beatrice.vellin@sanofi.com

VEYRAT-MASSON Richard

Hématologie biologique
CHU Estaing
1 place Lucie Aubrac
63003 CLERMONT-FERRAND – FRANCE
Tél. : +33 (0)4 73 75 02 00
Fax : +33 (0)4 73 75 02 07
rveyrat@chu-clermontferrand.fr

VIDEAU Florence

Proteigene
7, rue Léo Lagrange
BP 1134
27950 SAINT MARCEL – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 32 64 45 45
Fax : +33 (0)2 32 64 30 72
videau@proteigene.com

VINCENT Laure

Institut de Recherche en Biothérapie
Hôpital St-Eloi
80, avenue Augustin Fliche
34295 MONTPELLIER – FRANCE
laure.vincent@inserm.fr

VOLUER Pascal

Oxxius SA
4, rue Louis de Broglie
22300 LANNION – FRANCE
Tél. : +33 (0)2 96 48 70 28
Fax : +33 (0)2 96 48 21 90
pvoluer@oxxius.com

WAGNER-BALLON Orianne

Laboratoire d'hématologie
Hôpital Henri Mondor
51, avenue du maréchal de Lattre de Tassigny
94010 CRÉTEIL Cedex – FRANCE
Tél. : +33 (0)1 49 81 28 80
Fax : +33 (0)1 49 81 28 78
orianne.wagnerballon@hmn.aphp.fr

WAUTERS Jella

Dept. of Pharmacology, Toxicology and Bio-
chem

Ghent Université

Salisbury LN133

B-9820 MERELBEKE – BELGIQUE

Tél. : +32 92 64 73 56

Jella.Wauters@ugent.be

WOEHL Blanche

Dako France

Rue des Charmes

Cs 20555

78197 TRAPPES – FRANCE

blanche.woehl@dako.com

ZIVOJNOVIC Marija

Université Paris Descartes

12, rue de l'École de Médecine

75006 PARIS – FRANCE

marija.zivojnovic@inserm.fr

Cytométrie / Cytometry 2011



15^e Congrès Annuel / Annual Meeting

Liste et plan des exposants





Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Exposants

ADB SEROTEC

Stand 18

Fabricant d'anticorps
Endeavour House
Langford Business park, Langford Lane
OX51GE KIDLINGTON, OXFORD – ANGLE-
TERRE, RU
Tél. : +49 211 2395 6435
Fax : +49 211 2395 6499
E-mail : hafida.zaim@abdserotec.com

ALEXION PHARMA FRANCE

Stand 10

Alexion est une société de biotechnologie engagée dans la recherche et la distribution de thérapies innovantes pour les patients atteints de maladies rares.
15, boulevard de l'Amiral Bruix
75016 PARIS
Tél. : +33 (0)1 53 64 39 81
Fax : +33 (0)8 05 54 01 28
E-mail : bremontj@alxn.com

BD BIOSCIENCES

Stands 13 - 14 - 15

Cytométrie en flux - Imagerie - Réactifs et consommables pour l'analyse et la culture cellulaire
11, rue Aristide Berges
BP 4
38800 LE PONT-DE-CLAIX
Tél. : +33 (0)4 76 68 32 98
Fax : +33 (0)4 76 68 55 10
E-mail : isabelle_bobichon@europe.bd.com

BECKMAN COULTER FRANCE

Stands 1 - 2 - 3 - 4

Société d'instrumentation scientifique de haute technologie qui fabrique et entretient des analyseurs dans les domaines du diagnostic, de la recherche et de l'industrie.
Paris Nord 2 - 33, rue des Vanesses
BP 54359 - Villepinte
95942 ROISSY CDG Cedex
Tél. : +33 (0)1 49 90 90 00
Fax : +33 (0)1 49 90 91 60
E-mail : beckman_france@beckman.com

CELEZA - FLOWJO

Stand 26

Formations, support technique et vente en Europe pour le logiciel d'analyse de données de cytométrie de flux, Flowjo.
Bachweg 46
46000 OLTEN – SUISSE
Tél. : +41 44 586 1130
E-mail : info@celeza.ch

CLINISCIENCES

Stand 19

Distribution de produits réactifs et instruments pour l'immunologie, la biologie cellulaire et la biologie moléculaire.
183, Avenue Georges Clémenceau
92000 NANTERRE
Tél. : +33 (0)9 77 40 09 09
Fax : +33 (0)9 77 40 10 11
E-mail : info@clinisciences.com

COBOLT AB

Stand 30

Supplies diode-pumped, solid-state lasers (DPSSLs) in the visible and near-infrared for stand-alone use or OEM integration.
Vretenvägen 13
SE-171 54 SOLNA – SWEDEN
Tél. : +46 8 545 912 30
Fax : +46 8 545 912 31
E-mail : info@cobolt.com

DAKO FRANCE

Stand 5

Commercialise des produits de laboratoire et hôpitaux : anticorps, instruments et logiciels.
Rue des Charmes
CS 20555
78197 TRAPPES Cedex
Tél. : +33 (0)1 30 50 00 50
Fax : +33 (0)1 30 50 00 11
E-mail : blanche.woehl@dako.com

EBIOSCIENCE

Stand 17

eBioscience fournit des réactifs innovants de haute qualité dans les domaines de l'immunité cellulaire et de l'oncologie. Notre vaste portefeuille, composé de produits de pointe dédiés à l'analyse cellulaire, aux technologies axées sur la cytométrie de flux et l'immunodétection, est en constante évolution et désigne eBioscience comme le partenaire privilégié des chercheurs.
Campus Vienna Biocenter 2
1030 VIENNA – AUTRICHE
Tél. : +43 1 796 40 40 121
Fax : +43 1 796 40 40 400
E-mail : info@ebioscience.com

ENZO LIFE SCIENCES

Stand 21

Enzo Life Sciences développe, produit et commercialise plus de 8000 produits et réactifs innovants pour la recherche incluant anticorps, enzymes, protéines, marqueurs fluorescents, Kits Elisa, produits chimiques et naturels.
13, avenue Albert Einstein
69100 VILLEURBANNE
Tél. : +33 (0)4 72 44 06 55
Fax : +33 (0)4 37 48 42 39
E-mail : info-fm@enzolifesciences.com

EXCILONE

Stand 24

Trier des cellules rares à partir d'une suspension cellulaire pour une analyse génomique avec le DEPArray.
www.excilone.com/silicon-biosystems/44.html
3, rue de la Mairie
78490 VICQ
Tél. : +33 (0)1 34 86 77 01
Fax : +33 (0)1 34 86 77 53
E-mail : pierre.defrenaix@excilone.com



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Exposants

FLUIDIGM

Stand 32

Fluidigm développe, fabrique et commercialise 3 types de systèmes micro-fluidiques et 8 puces différentes auprès des sociétés pharmaceutiques et de biotechnologie, des institutions académiques, des laboratoires de diagnostic et sociétés agro-alimentaires.

Sales and Marketing Specialist, Europe
15, avenue de Norvège
91140 VILLEBON SUR YVETTE
Tél. : +33 (0)1 60 92 42 40
Fax : +33 (0)1 60 92 42 40
E-mail : info-europe@fluidigm.com

HORIBA MEDICAL

Stand 27

Conçoit, développe et distribue des automates de diagnostic in vitro dans les domaines de l'hématologie et chimie clinique.

Marketing
Parc Euromédecine - Rue du Caducée
BP 7290
34184 MONTPELLIER Cedex 4
Tél. : +33 (0)4 67 14 17 31
Fax : +33 (0)4 67 14 17 55
E-mail : aurelie.delaune@horiba.com

LIFE TECHNOLOGIES

Stand 12

Life Technologies est une société développant et commercialisant des instruments, consommables et services destinés à la recherche scientifique dans le domaine des sciences de la vie.

25, avenue de la Baltique
BP 96
91943 COURTABOEUF Cedex
Tél. : +33 (0)1 69 59 85 39
Fax : +33 (0)1 69 59 85 00
E-mail : corinne.malphettes@lifetech.com

MERCK MILLIPORE

Stand 11

Merck Millipore is the Life Science division of Merck KGaA of Germany and offers a broad range of innovative products, services and business relationships that enable our customers' success in research and development.

www.merckmillipore.com"
DSMS
BP 307
78054 SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES Cedex
Tél. : +33 (0)1 30 12 72 35
Fax : +33 (0)1 30 12 71 80
E-mail :
frcustomerservice@merckgroup.com

MILTENYI BIOTEC

Stand 9

Société de biotechnologie leader dans le domaine de la séparation cellulaire et intervenant novateur en cytométrie de flux et biologie moléculaire.

10, rue Mercœur
75011 PARIS
Tél. : +33 (0)1 56 98 16 16
Fax : +33 (0)1 56 98 16 17
E-mail : macs@miltenyibiotec.fr

NIKON

Stand 29

Nikon accompagne les chercheurs dans les secteurs d'investigations et applications en leur fournissant des solutions de microscopie innovantes.

Division instruments
191, rue du Marché Rollay
94504 CHAMPIGNY-SUR-MARNE Cedex
Tél. : +33 (0)1 45 16 46 60
Fax : +33 (0)1 45 16 45 55
E-mail : agnes.vernet@nikon.fr

OVIZIO IMAGING

Stand 6

4D Quantitative Imaging
Digital Holographic Microscopy
Rue Engeland 555
1180 BRUXELLES - BELGIQUE
Tél. : +32 2 600 5095
E-mail : joel.henneghien@ovizio.com

OXXIUS LASERS

Stand 8

Conception et fabrication de lasers continus UV, visibles et IR pour la cytométrie en flux, l'imagerie de fluorescence et la spectroscopie.

4, rue Louis de Broglie
22300 LANNION
Tél. : +33 (0)2 96 48 70 28
Fax : +33 (0)2 96 48 21 90
E-mail : pvouer@oxxius.com

OZYME

Stand 7

Biologie moléculaire, biologie cellulaire, immunologie et cytométrie.

BP 268
78053 SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES Cedex
Tél. : +33 (0)1 34 60 24 24
Fax : +33 (0)1 30 45 50 35
E-mail : cbiojout@ozyme.fr

PARTEC

Stand 28

Fabrication et distribution de cytomètres en flux, microscopes à fluorescence et de solutions réactifs/filtration.

14/16, rue Gallieni
91700 SAINTE GENEVIÈVE DES BOIS
Tél. : +33 (0)1 69 04 87 12
Fax : +33 (0)1 69 04 90 38
E-mail : partecfrance@partec.com

PERKINELMER

Stand 31

Fournisseur de solutions complètes en sciences de la vie (instruments, réactifs, services), robotique.

ZA Courtaboeuf
16, avenue du Québec - Bâtiment Lys
91940 VILLEBON SUR YVETTE
Tél. : +33 (0)805 111 333
Fax : +33 (0)805 111 334
E-mail : marketing.france@perkinelmer.com



Cytométrie / Cytometry 2011

Liste des Exposants

PROTEIGENE

Stand 16

Proteigene propose une large gamme de systèmes, consommables et réactifs en géromique, protéomique, biologie cellulaire et imagerie.

7, rue Léo Lagrange

BP 1134

27950 SAINT MARCEL

Tél. : +33 (0)2 32 64 45 45

Fax : +33 (0)2 32 64 30 72

E-mail : info@proteigene.com

ROCHE DIAGNOSTICS FRANCE

Stand 20

Leader de l'industrie pharmaceutique et diagnostics axée sur la recherche. Leader mondial du diagnostic in-vitro ainsi que du diagnostic histologie du cancer et gestion du diabète.

2, avenue du Vercors

BP 59

38242 MEYLAN Cedex

Tél. : +33 (0)4 76 76 30 87

Fax : +33 (0)4 76 76 46 51

E-mail : christelle.farrugello@roche.com

SARTORIUS STEDIM

Stand 22

Equipements et réactifs pour l'analyse cellulaire.

Cell Culture and Purification Lab Technologies

ZI des Paluds, Avenue de Jouques

13781 AUBAGNE

Tél. : +33 (0)4 42 84 56 00

Fax : +33 (0)4 42 84 65 45

E-mail : sonia.meconi@sartorius-stedim.com

STEMCELL TECHNOLOGIES

Stand 25

Stemcell Technologies est leader dans les milieux de cultures spécialisées et propose des produits de séparation cellulaire.

Miniparc Polytec - Bâtiment Sirocco

40, rue des Berges

38000 GRENOBLE

Tél. : +33 (0)4 76 04 75 30

Fax : +33 (0)4 76 18 99 63

E-mail : info.eu@stemcell.com

THERMO SCIENTIFIC

Stand 23

Thermo Scientific represents high-end analytical instruments, chemistry and consumable supplies, laboratory equipment, software and services that enable integrated laboratory workflow solutions.

BP 5

62117 BREBIÈRES

Tél. : +33 (0)800 508 215

Fax : +33 (0)800 698 323

E-mail : gerrit.huysmans@thermofisher.com



Cytométrie / Cytometry 2011

Plan de l'exposition

