Association Française de Cytométrie

Association loi 1901 - N° SIRET : 399 911 031 00033 - Code APE : 7219Z

COMPTE RENDU CONGRES CYTO_ISAC 2022

IDENTITE

Nom - Prénom :

ANDRIEU THIBAULT

Coordonnées :

Adresse : CENTRE DE RECHERCHE EN CANCEROLOGIE DE LYON (CRCL), 28 RUE LAENNEC, CENTRE LEON BERARD, (CLB) 69008 LYON

E-mail : thibault.andrieu@inserm.fr

Tel. : 0469856421

Statut :

INGENIEUR DE RECHERCHE, RESPONSABLE DE LA PLATEFORME DE CYTOMETRIE RECHERCHE ET TRANSLATIONNELLE CRCL/CLB

Nom de l'organisme d'appartenance :

INSERM U1052

Nom et adresse du Laboratoire ou Plateforme d'appartenance :

PLATEFORME DE CYTOMETRIE RECHERCHE ET TRANSLATIONNELLE CRCL/CLB
UMR INSERM 1052 CNRS 5286 Mixte CLB
Centre Léon Bérard - Cheney B 3ème étage
28 rue Laennec, 69373 LYON cedex 08, France

Je souhaite avant toute chose remercier l'Association Française de Cytométrie pour son soutien au travers de l'obtention pour cette année d'une subvention de mobilité pour me rendre au congrès CYTO 2022.

MOTIVATIONS

Description de l'intérêt du congrès CYTO :

Je suis membre de l'association internationale de cytométrie (ISAC "International Society for Advancement of Cytometry") depuis plus de 10 ans. Comme l'Association Française de Cytométrie (AFC) à l'échelon national, l'ISAC représente un formidable moyen de partage et d'échange autour de cette technologie, pour laquelle, je me suis engagé depuis plus de 20 ans. Lors des éditions précédentes du congrès CYTO, j'ai eu l'occasion d'échanger avec différentes personnes sur des sujets importants comme (i) la biosécurité (e.g Dr S Monard), (ii) la standardisation des acquisitions (e.g Dr A Brooks) ou encore (iii) l'analyse des données à haut contenu d'informations (e.g Dr S Van Gassen). Mais j'ai réellement mesuré l'impact du congrès CYTO et de ses apports lors du déploiement de la cytométrie de masse en 2011-2012 sur Lyon.

Aujourd'hui je suis directeur opérationnel d'une nouvelle plateforme de cytométrie Recherche et Translationnelle au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) / Centre Léon Bérard (CLB). Nous avons décidé de

développer des projets en utilisant la cytométrie spectrale qui reste une technologie émergente combinée avec l'analyse transcriptomique et le tri.

Cette année encore ma participation au congrès CYTO 2022 a représenté une opportunité formidable de rencontrer des utilisateurs expérimentés en cytométrie spectrale, de développer des collaborations qui sont essentielles pour développer cette technologie de manière structurée et efficace aussi bien pour la recherche fondamentale et translationnelle menée au CRCL/CLB que pour des échanges au sein du réseau Français « spectral » piloté l'AFC.

COMPTE RENDU NON EXHAUSTIF DU CONGRES CYTO2022

Retour sur les bénéfices pour le laboratoire d'appartenance et la communauté locale :

- Nous avons eu l'opportunité de présenter notre travail durant le congrès CYTO 2022 avec une communication écrite dont l'intitulé est " Immune landscape of human colorectal tumors by optimized deep spectral immunophenotyping". Ce travail repose sur une collaboration technique et scientifique avec une équipe de recherche du CRCL.

- Durant la présentation de ce travail différentes remarques ont pu être échangées avec des personnes travaillant dans la bio-informatique en particulier et sur la méthode de clustering que nous avons utilisée pour le décryptage de nos données. Nous nous sommes ainsi focalisés sur l'utilisation de l'algorithme FlowSOM qui est aujourd'hui un algorithme de référence pour l'isolement des populations connues ou inconnues pouvant présenter une modulation dans les conditions expérimentales. Au cours de nos échanges l'**utilisation de CITRUS** nous a été suggéré. CITRUS peut présenter un plus non négligeable pour notre travail. **CITRUS est capable de prédire de la différence entre deux groupes d'études de manière complètement automatisé et d'isoler des signatures biologiques statistiquement significatives**. CITRUS trouve son application dans toute analyse nécessitant la comparaison de groupes d'échantillons. Dans notre cas entre l'isolement des populations cellulaires d'un tissus sain et cancéreux obtenus à partir d'une même biopsies de patient atteint d'un cancer colorectale.

- Nous avons par ailleurs plusieurs projets de développement centrés sur l'isolement par tri cellulaire de populations rares présentes dans les tumeurs, combiné à de l'analyse transcriptomique à l'échelle de la cellule unique (scRNAseq). La combinaison de ce deux technologies (tri et scRNAseq) doit permettre un niveau important de compréhension du microenvironnement tumoral à l'échelle multi-omics.

- Dans ce contexte évolutif l'une de nos problématique qui est surement partagée avec les cytométristes de l'AFC est la **discordance entre le nombre de cellules triées et les résultats d'encapsulation des cellules**. Il semblerait après avoir échangé avec plusieurs personnes que le nombre de cellules soit un **point commun et problématique à l'ensemble des expérimentateurs** combinant ces deux techniques. Il n'y a pas de critères techniques simple qui se dégagent concrètement pour le moment afin de résoudre ce problème mais uniquement des ajustements/optimisations personnalisés en fonction des conditions (i) de tri, (ii) d'extraction des cellules et de (ii) traitement post tri des cellules (comptage, centrifugation …). **La future création au sein de l'AFC d'un groupe multi-omiques est d'ailleurs une très bonne chose pour échanger sur cette nouvelle problématique en particulier lors de l'isolement de sous populations extrêmement rares**. Dans notre cas il s'agit de cellules rares infiltrant la tumeur pour lesquelles une analyse transcriptomique et réalisée après isolement de ces dernières sur trieur de cellules à l'aide de panels 15-16 paramètres.

- En 2020, la région de Lyon (« Only Lyon ») s'est portée candidate pour accueillir le congrès CYTO de l'ISAC en France. Je fais partie du pré-comité d'organisation regroupant des cytométristes lyonnais, et j'ai été nommé par la présidente de l'AFC (Dr C Blanc) en tant que responsable des relations avec l'ISAC dans le

cadre de ce projet. Le congrès CYTO 2022 sera donc le lieu idéal pour échanger, structurer et mette en place les collaborations nécessaires à l'organisation d'un tel évènement en France dans les années à venir.

- Sur ce point nous avons de manière indépendante, avec le Dr Aida Meghraoui, réalisé un lobbying auprès des cadres de l'ISAC. Malheureusement au jour où je réalise ce CR nous avons eu l'information que compte tenu de problèmes financiers au sein de l'ISAC, **l'association cherche une nouvelle orientation et a donc pour l'instant abandonné le congrès 2024 en Europe** ; peut-être que l'association souhaite revenir sur un format précédent ou le congrès était organisé tous les deux ans.

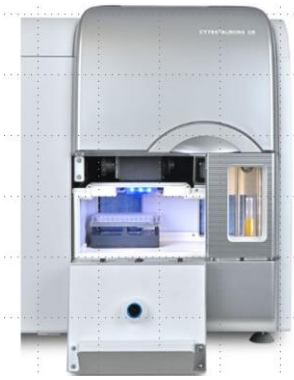
Retour sur des thématiques d'intérêts ciblées :

- Avancés et technologies combinant l'utilisation de la cytométrie et du tri spectral.

- Cette année l'analyse spectrale était mise en avant avec un recul des présentations de résultats obtenus avec de la cytometrie de masse. La cytometrie spectral a en effet réellement démocratisée depuis quelques années l'analyse multi paramétrique a haut contenu d'information jusqu'ici l'atout unique de la cytometrie de masse. Ceci à été rendu possible en particulier grâce et l'arrivée depuis 2018 des cytomètres spectraux à lasers décalés de chez Cytek ou plus récemment avec le BD A5.2.
  Nous avons ainsi pu assister à des présentations utilisant jusqu'à 59 marqueurs simultanés et combinés par technique sentinelle.

- Cette année a aussi été marqué par l'introduction de **deux nouveaux trieurs remarquables**. Le trieur de chez cytek (1) **Aurora CS** et le trieur de chez BD Biosciences (2) le **BD FACSDiscover** prévu en deux versions pour le moment à savoir (i) spectral / conventionnel ou (ii) spectral + module image qui est accompagné d'un nouveau logiciel « cellview » dans l'application FACSChorus qui pilote l'appareil comme pour le FACS Melody (https://www.bdbiosciences.com/en-us/learn/campaigns/cell-view-image-technology#Overview). Ce dernier en plus d'une analyse à spectre entier est capable de fournir et de trier sur des paramètres morphométriques et de colocalisation cellulaire par exemple. Ceci est rendu possible par l'utilisation de PMTs combinés à un déflecteur laser opto-accoustique comme ceux utilisés en microscopie pour fragmenter horizontalement le laser bleu et ainsi « scanner » la cellule durant le temps de passage devant le laser « étalé ». L'image est ensuite recréée en temps réel. L'information analytique qui est recueillie, comme une circonférence par exemple, est ensuite gérée comme un paramètre de fluorescence pour le tri.

Cytek CS



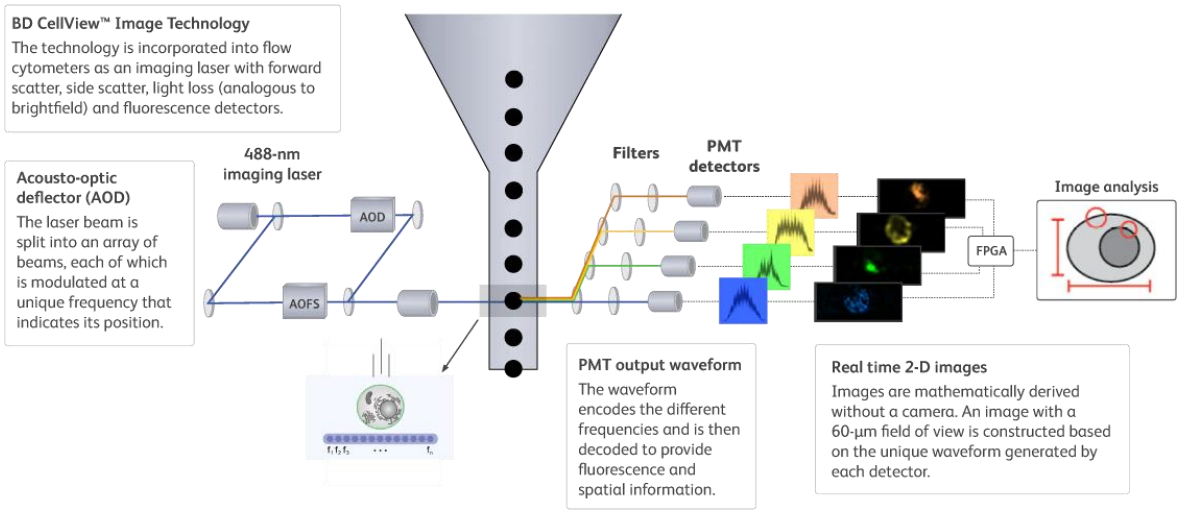
- Trieur Full spectrum
- Jusqu'à 5 lasers (355, 405, 488, 561, 640nm)
- 64 détecteurs (64 +3) APD's
- Buses : 70, 100, 130µm
- 6-voies
- 96-w
- SpectroFlo Software

FACSDiscover

High-speed fluorescence image–enabled cell sorting

- 3 – 5 Lasers (349-405-488-561-638nm)
- 52 – 86 Detecteurs (PMT's)
- 6 détecteurs pour l'imagerie (488nm)
- Uniquement Spectral
- 6-voies (5ml tubes)
- 96-w + 384-w
- Les LED automatisées permettent un contrôle des détecteurs.

Vue d'ensemble du fonctionnement Spectral + module image (uniquement sur le laser Bleu – 488nm)

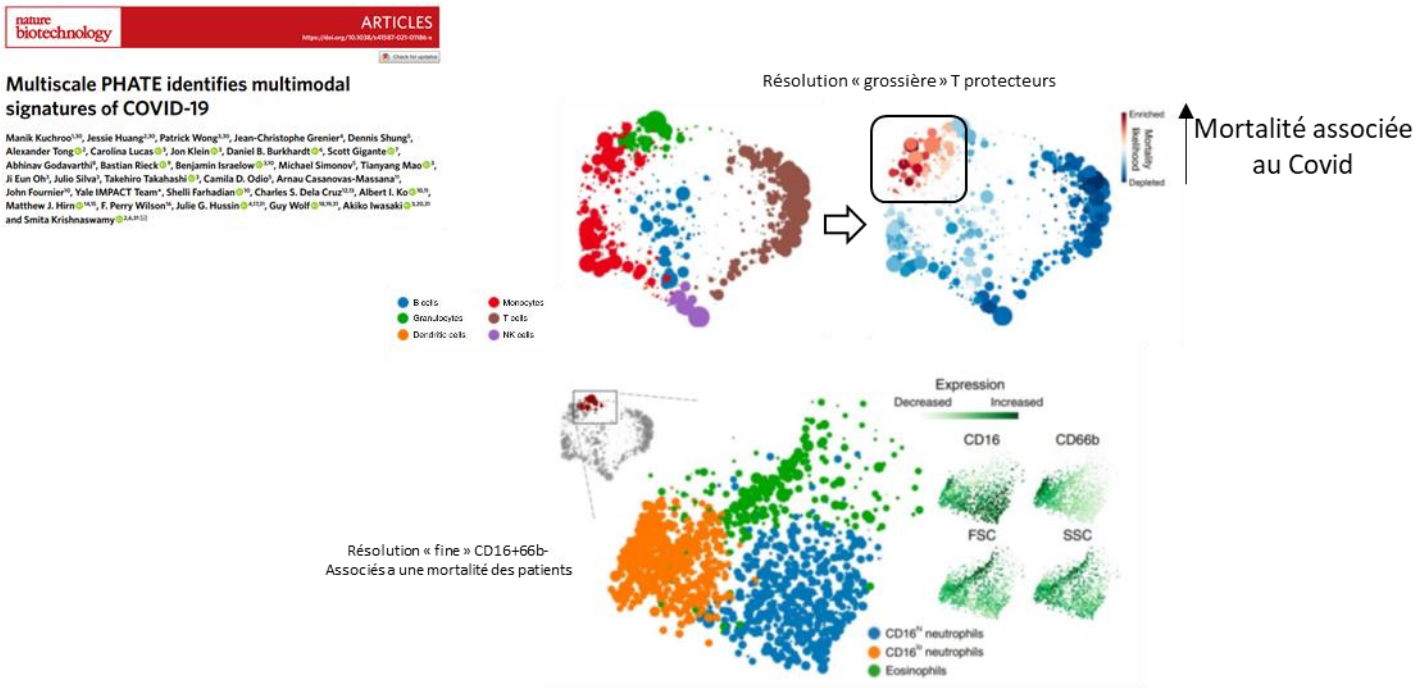


- Avancés mathématiques dans l'analyse de données.

➢ Dans les étapes importantes de l'analyse manuelle ou automatisée il est essentiel **d'exclure les cellules de « faible qualité »** comme définie par FlowAI. L'objectif est d'augmenter la qualité de l'analyse et de prévenir les clusters donnés par des agrégats ou d'autres artefacts. Dans ce domaine **PeacoQC (Peak Extraction And Cleaning Oriented Quality Control**) évalue la qualité du flux sans être trop strict. Ce dernier présente différents avantages comme (i) une même vitesse d'analyse que FlowAI, (ii) il gère de plus gros fichier, et (iii) il supprime moins de cellules. Cet algorithme gère aussi bien les données de cytométrie spectrale, de masse ou conventionnelle.

PeacoQC
Emmaneel et al.

➢ Dans les autres étapes de l'analyse des données on utilise la réduction dimensionnelle pour avoir accès à la structure local des données. Pour cela on utilise généralement des algorithmes comme tSNE et ses variantes ou UMAP par exemple. Ces algorithmes fournissent généralement au maximum 3 niveaux de hiérarchie : « grand parents, enfants et petits-enfants ». Dans ce contexte vient d'apparaitre PHATE pour « Potential of Heat-diffusion for Affinity-based Transition Embedding". Il s'agit ici d'un algorithme topographique comme celui utilisé par METAFLOW (https://www.metafora-biosystems.com/metaflow/). PHATE donne ici accès à un niveau plus profond dans la structure locale des données pour devenir probablement la prochaine référence des algorithmes de réduction dimensionnelle comme illustré ci-après.



- Avancés technique pour la standardisation

➢ Aujourd'hui plusieurs méthodes de standardisation existent : 2.5 SDen, utilisation de billes 8 pics avec cibles MFI ou autres. Ces méthodes sont souvent couplées à de la normalisation de données à l'aide d'algorithmes comme fdNorm ou CytoNorm par exemple. L'utilisation de ces algorithmes et/ou la mise en œuvre de la standardisation se fait en combinaison avec l'utilisation de billes. Au cours de l'ISAC nous avons pu découvrir Slingshot (https://shop.slingshotbio.com/products/spectracomp). Il s'agit d'un nouveau fabricant des billes qui sont en fait comme des cellules synthétiques à base de polymères. Ces billes sont semi-transparentes et granuleuses ce qui permet de mimer un antigène qui serait fixé à une cellule et avec une densité antigénique désirée. Elles sont ainsi paramétrables pour s'adapter à n'importe quelle cible et définir ainsi une référence ou standard.

Pour finir je souhaiterai vous dire que ma participation au congrès 2022 de l'ISAC m'a réellement permis d'échanger sur le travail que je réalise quotidiennement et m'a également donné l'opportunité de découvrir le travail des autres plateformes ou Chercheurs extra Nationaux. Ce qui a été une chance

Par ailleurs j'espère que ce retour non exhaustif combiné à la présentation faite durant la dernière réunion du groupe « spectral » de l'AFC, ainsi que les échanges qui y ont été réalisés, auront permis de vous faire un retour complet du dernier congrès CYTO 2022.

Veuillez recevoir, Madame la Présidente et Mesdames, Messieurs les membres du bureau de l'Association Française de Cytométrie, mes sincères salutations.

M. Thibault ANDRIEU