

INNOVATIONS 2024

EN BIOLOGIE HÉMATOLOGIQUE

Le service de Biologie hématologique est désormais réparti entre deux départements. Le **Département de Biologie Clinique** regroupe les laboratoires d'hématologie et morphologie, d'hémostase, de cytométrie en flux, d'immunologie leucoplaquettaire et de biologie moléculaire onco-hématologique. Par ailleurs, le laboratoire d'immunologie érythrocytaire et la banque de sang ont rejoint les **Banques de Matériel Corporel Humain**. Les biologistes impliqués collaborent pour développer de nouveaux concepts et analyses, visant à optimiser la prise en charge et la sécurité des patients.

Le **Laboratoire de cytométrie en flux** a franchi une grande étape technologique avec l'acquisition de nouveaux automates permettant de marquer les cellules d'intérêt au moyen de 12 anticorps combinés à des fluorochromes différents. On n'est pas loin de pouvoir « retrouver une aiguille dans une botte de foin ». Ce projet est en cours de validation et entrera progressivement en routine dans le courant de l'année 2025. Il reflète un engagement continu en faveur de l'innovation technique pour répondre aux besoins croissants en onco-hématologie et en médecine de précision.

Au cours des dernières décennies, l'immunothérapie a révolutionné le traitement des cancers. Au sein de ces nouvelles armes, les CAR-T cells ont démontré leur efficacité dans la prise en charge des hémopathies malignes. Cependant, l'utilisation clinique des CAR-T cells révèle une variabilité interindividuelle marquée, tant en termes de réponse antitumorale que de durée de rémission. Dans ce contexte, l'immunomonitoring s'impose comme un outil prédictif clé pour identifier les patients à risque et adapter les stratégies thérapeutiques. Le **Laboratoire de biologie moléculaire onco-hématologique** a mis en place un suivi régulier chez les patients traités afin de pouvoir corréler des biomarqueurs immunologiques et pharmacocinétiques avec les événements cliniques. Les résultats préliminaires sont très encourageants.

Les hôpitaux doivent respecter des normes strictes en matière de conservation des composants sanguins. Ces normes visent à limiter les risques d'infections bactériennes transmises par le sang, à maintenir la viabilité cellulaire et l'efficacité protéique, et à réduire les pertes de sang. Ce dernier point est essentiel non seulement pour une bonne gestion financière de la banque de sang, mais surtout par respect éthique pour les donneurs de sang. C'est dans cette optique que la **Banque de Sang** a mis en place un système de contrôle de la température lors des transports des concentrés de globules rouges, permettant une meilleure surveillance et la remise en stock des concentrés non utilisés pour éviter le gaspillage. Différents maillons faibles ont été identifiés et progressivement corrigés. Les conditions optimisées de conservation des concentrés de globules rouges assurent désormais la sécurité et l'efficacité des patients, tout en réduisant les pertes de poches de sang.

Actuellement, le risque le plus important en transfusion se situe au chevet du patient, lorsqu'il existe des manquements en matière d'identitovigilance. Puisque le risque de se tromper de patient lors d'un prélèvement de sang est d'environ un sur deux mille, les sociétés internationales de transfusion exigent que le groupe sanguin soit réalisé sur deux échantillons indépendants. Ceci n'est pas toujours facile à mettre en pratique et de nombreux contournements de procédure sont observés. Pour éviter la tentation de prélever les deux échantillons en même temps, le **Laboratoire d'immunologie érythrocytaire**, en collaboration avec le service informatique, a mis en place l'ajout automatique d'une demande de groupe sanguin sur une prescription d'hémogramme pour un patient hospitalisé dont le groupe sanguin n'est pas encore connu. En cas de demande de transfusion pour ce patient, une simple confirmation de ce groupe sanguin sur un nouvel échantillon sera suffisante. Cette mesure améliore considérablement la sécurité des patients.

*Véronique Deneys, Youssra Khaouch, Antoine Laffalize, Kamila Lamraoui, Afisa Mugeni, Arnaud Nevraumont, Christine Pirlet, Romane Ponthot, Madeleine Rousseaux, Corentin Streel, Valentine Thibaut, Marie-Astrid van Dievoet, Pascale Saussoy**

MOTS-CLÉS ► Cytométrie en flux, hémopathies, CAR-T, chaîne du froid, transfusion, identitovigilance, groupe sanguin

Innovations 2024 in Hematological Biology

The Hematology Biology Department is now divided into two departments. The **Clinical Biology Department** includes the hematology and morphology, hemostasis, flow cytometry, HLA/HPA, and onco-hematology molecular biology laboratories. In addition, the erythrocyte immunology laboratory and the blood bank have joined the **Human Body Material Banks**. The biologists involved work together to develop new concepts and analyses aimed at optimizing patient care and safety.

The **Flow Cytometry Laboratory** has taken a major technological step forward with the acquisition of new automated systems for labeling cells of interest using 12 antibodies combined with different fluorochromes. We are not far from being able to "find a needle in a haystack". This project is being validated and will gradually become routine in 2025. It reflects an ongoing commitment to technical innovation to meet the growing needs of onco-hematology and precision medicine. Over the last few decades, immunotherapy has revolutionized cancer treatment. Among these new weapons, CAR-T cells have demonstrated their efficacy in the treatment of hematological malignancies. However, the clinical use of CAR-T cells revealed marked inter-individual variability in terms of anti-tumor response and remission duration. In this context, immunomonitoring is emerging as a key predictive tool for identifying patients at risk and adapting therapeutic strategies. The **Onco-Hematology Molecular Biology Laboratory** has set up regular monitoring of patients undergoing treatment in order to correlate immunological and pharmacokinetic biomarkers with clinical events. Preliminary results are very encouraging.

Hospitals must comply with strict standards for blood component storage. These standards aim to limit the risk of blood-borne bacterial infections, maintain cell viability and protein efficiency, and reduce blood loss. This last point is essential, not only for financial management of the blood bank, but above all out of ethical respect for blood donors. With this in mind, the **Blood Bank** has set up a system for monitoring the temperature at which red blood cell concentrates are transported, so that unused concentrates can be better monitored and returned to stock to avoid waste. Various weak links have been identified and gradually corrected. Optimized storage conditions for red blood cells now ensure patient safety and efficacy, while reducing blood bag losses.

Currently, the greatest risk in transfusion is at the patient's bedside, when there are failures in identitovigilance. Since the risk of drawing blood from the wrong patient is around one in 2,000, international transfusion societies require blood typing to be carried out on two independent samples. This is not always easy to put into practice, and many procedural bypasses have been observed. To avoid the temptation to take both samples at the same time, the **Erythrocyte Immunology Laboratory**, in collaboration with the information technology department, has introduced the automatic addition of a blood type request to a hemogram prescription for a hospital patient whose blood group is not yet known. If a transfusion is requested for this patient, simple blood type confirmation on a new sample will be enough. This measure considerably improves patient safety.

KEYWORDS

Flow cytometry, hemopathy, CAR-T cells, cold chain, transfusion, identitovigilance, blood type

SOMMAIRE

Une avancée technologique pour le laboratoire de cytométrie en flux des CuSL
Madeleine Rousseaux, Kamila Lamraoui, Valentine Thibaut, Antoine Laffalize, Romane Ponthot, Pascale Saussoy

Immunomonitoring lors de la thérapie par cellules CAR-T : apport de la biologie moléculaire
Pascale Saussoy, Afisa Mugeni, Kamila Laraoui, Antoine Laffalize, Valentine Thibaut, Romane Ponthot, Madeleine Rousseaux.

L'espion qui venait du froid
Christine Pirlet, Corentin Streeel, Arnaud Nevraumont, Youssra Khaouch, Véronique Deneys

Quand l'hélogramme devient partenaire de la sécurité transfusionnelle
Youssra Khaouch, Véronique Deneys, Christine Pirlet, Marie-Astrid van Dievoet, Corentin Streeel

AFFILIATIONS

Service de Biologie Hématologique, Cliniques universitaires Saint-Luc UCL, Université Catholique de Louvain Bruxelles, Belgique

* Cheffe du service de Biologie Hématologique

CORRESPONDANCE

Pre Véronique Deneys
Cliniques universitaires Saint-Luc - UCLouvain
Service de Biologie hématologique
Avenue Hippocrate 10
B-1200 Bruxelles

UNE AVANCÉE TECHNOLOGIQUE POUR LE LABORATOIRE DE CYTOMÉTRIE EN FLUX DES CUSL

Madeleine Rousseaux, Kamila Lamraoui, Valentine Thibaut, Antoine Laffalze, Romane Ponthot, Pascale Saussoy

En 2024 le laboratoire de cytométrie en flux des Cliniques universitaires Saint-Luc (CuSL) a franchi une étape dans son développement technologique avec l'acquisition d'une nouvelle plateforme de cytométrie composée de deux cytomètres BD FACSLytic 12 couleurs accompagnés d'un préparateur automatisé. Ce projet reflète un engagement continu en faveur de l'innovation technique pour répondre aux besoins croissants en onco-hématologie et en médecine de précision.

L'introduction de cette plateforme marque une avancée notable dans la capacité du laboratoire à offrir des analyses standardisées et dans l'analyse des données. Grâce à la configuration identique des deux cytomètres FACSLytic, il est désormais possible de garantir une parfaite harmonisation des résultats, réduisant ainsi les biais techniques et améliorant la comparabilité des données entre échantillons. De plus, le préparateur automatisé permettra une gestion optimale des échantillons en amont des analyses, réduisant les variations humaines et augmentant la reproductibilité des résultats tout en facilitant le flux des échantillons.

Une entrée en production progressive en 2025

L'intégration de cette nouvelle plateforme dans la routine du laboratoire sera progressive, débutant en 2025 avec la mise en place des tests quantitatifs. Ces derniers incluent :

- **La numération des progéniteurs CD34** dans le cadre des collectes de cellules souches hématopoïétiques, une étape clé dans le processus de greffe.
- **La numération des sous-populations lymphocytaires T CD4, T CD8, B et NK**, essentielles pour le suivi immunologique de nombreux patients.

Dans une seconde phase, le laboratoire prévoit d'étendre les capacités de cette plateforme en introduisant progressivement des panels multiparamétriques plus complexes, couvrant ainsi les différentes indications en onco-hématologie. Ces panels permettront une analyse fine des populations cellulaires tumorales et des sous-populations cellulaires normales associées, offrant ainsi une aide précieuse au diagnostic et au suivi thérapeutique.

Une étape clé vers la conformité IVDR

Ce projet s'inscrit également dans le cadre de la transition réglementaire vers l'*In Vitro Diagnostic Regulation* (IVDR), une norme européenne visant à renforcer la qualité et la sécurité des dispositifs de diagnostic in vitro. L'acquisition des cytomètres FACSLytic et de leur préparateur reflète l'engagement des CuSL à répondre aux exigences élevées de l'IVDR, notamment en matière de standardisation, de traçabilité et de validation des méthodes analytiques.

IMMUNOMONITORING LORS DE LA THÉRAPIE PAR CELLULES CAR-T : APPORT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Pascale Saussoy, Afisa Mugeni, Kamila Laraoui, Antoine Laffalze, Valentine Thibaut, Romane Ponthot, Madeleine Rousseaux

Introduction

Au cours des dernières décennies, l'immunothérapie a révolutionné le traitement des cancers, en exploitant la capacité du système immunitaire, notamment des lymphocytes T, à reconnaître et éliminer les cellules tumorales. Ce domaine s'est enrichi d'approches innovantes, dont le

développement des récepteurs antigéniques chimériques (CAR, pour *Chimeric Antigen Receptor*). Cette technologie combine la spécificité des anticorps monoclonaux avec les fonctions effectrices des lymphocytes T, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Les CAR-T cells, lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur chimérique, ont démontré une efficacité dans le traitement des hémopathies malignes. Ces thérapies ont transformé notamment la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) et des lymphomes B agressifs, où elles ciblent spécifiquement des marqueurs membranaires tels que le CD19. Malgré des résultats cliniques impressionnants, des défis persistent, notamment une variabilité interindividuelle de la réponse thérapeutique, des effets secondaires significatifs, et des coûts élevés de production.

Le processus de fabrication des CAR-T cells repose sur la collecte par aphérèse des lymphocytes T du patient, leur modification génétique en laboratoire, et leur réinfusion au patient après un traitement permettant le contrôle de l'hémopathie sous-jacente. Cette méthodologie autologue limite le risque de maladie du greffon contre l'hôte mais impose une logistique complexe et une hospitalisation prolongée. Le tisa-cel, (Kymriah®, Novartis) et le ciltacel (Yescarta®, Gilead) ont été les premières thérapies CAR-T approuvées en Europe pour des indications hématologiques, marquant ainsi une avancée majeure thérapeutique.

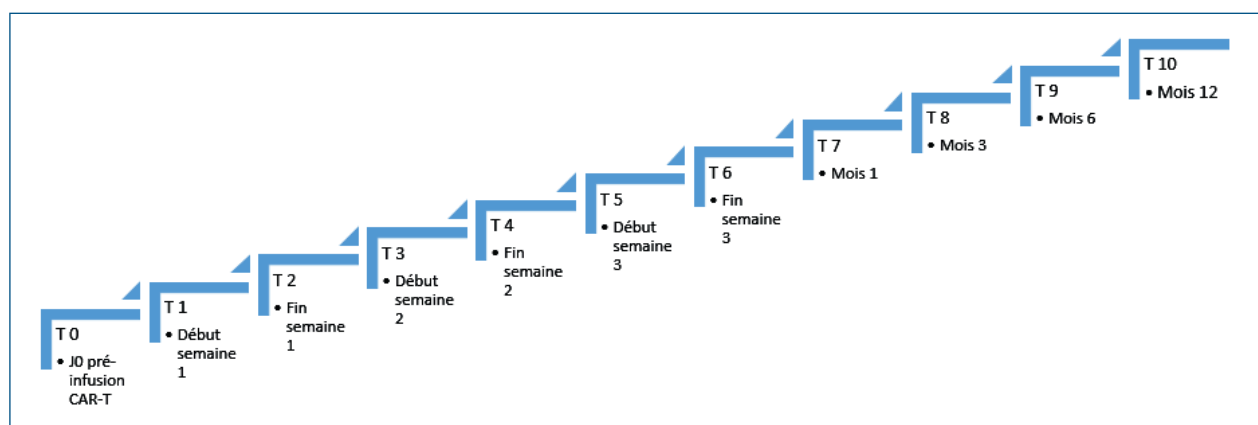
Face aux effets indésirables tels que le syndrome de libération des cytokines ou les neurotoxicités, des efforts de recherche se concentrent sur l'optimisation des CAR-T cells, le développement de nouvelles cibles thérapeutiques, et l'amélioration des protocoles de suivi personnalisé.

Objectif du développement

L'utilisation clinique des CAR-T révèle une variabilité interindividuelle marquée, tant en termes de réponse anti-tumorale que de durée de rémission. À cela s'ajoutent des défis tels que le développement d'effets indésirables potentiellement graves, incluant des toxicités systémiques. Cette hétérogénéité des réponses souligne la nécessité d'un suivi rigoureux et personnalisé pour optimiser les bénéfices cliniques tout en limitant les risques pour les patients.

Dans ce contexte, l'immunomonitoring s'impose comme un outil prédictif clé pour identifier les patients à risque et adapter les stratégies thérapeutiques. Il permet non seulement d'évaluer en temps réel l'efficacité de la thérapie CAR-T, mais également de guider les décisions cliniques pour prévenir ou gérer les complications. Le service de Biologie Clinique Hématologique des Cliniques universitaires Saint Luc a donc mis en place un suivi régulier chez quelques patients atteints d'un lymphome B durant leur première année post-réinfusion CAR-T afin de corréler des biomarqueurs immunologiques et pharmacocinétiques avec les événements cliniques. Au cours de cette première période test, ont été réalisés d'une part chez 10 patients le suivi pharmacocinétique des cellules CAR-T via des techniques de cytométrie en flux et de biologie moléculaire et d'autre part, le suivi de paramètres immunologiques, tels que la caractérisation des sous-populations lymphocytaires (T, B et NK) et le dosage plasmatique de diverses cytokines. Ces données ont été recueillies à intervalles réguliers (Figure 1).

FIGURE 1. Ligne du temps des prélèvements



Résultats préliminaires

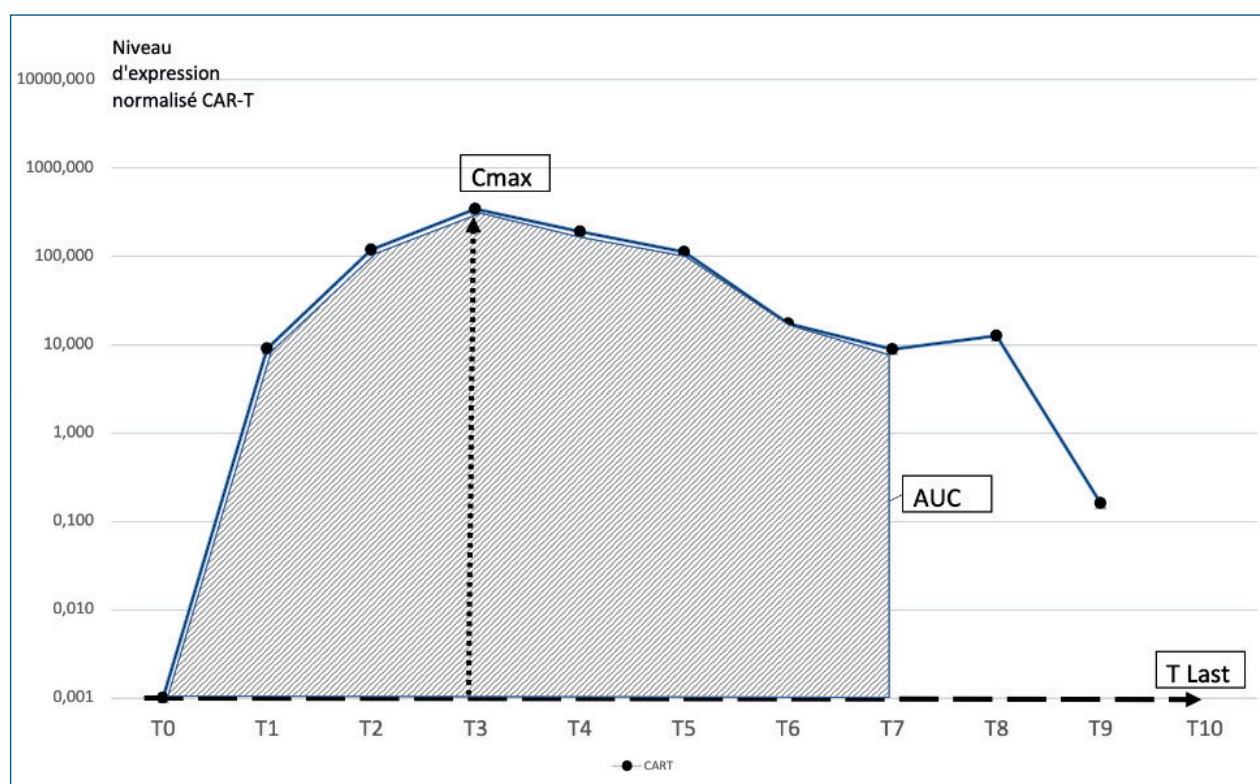
Les premières analyses moléculaires réalisées chez un patient permettent d'observer l'évolution du niveau d'expression des CAR-T mesurée par RTq-PCR, une méthode

hautement sensible et spécifique qui quantifie l'ARN messager codant pour le transgène CAR. Les résultats de la figure 2 montrent une dynamique caractéristique de l'ex-

pression normalisée des CAR-T, reflétant leur expansion, leur persistance et leur déclin progressif au fil du temps. On observe successivement :

1. **Une phase initiale d'expansion:** Une augmentation rapide du niveau d'expression des CAR-T est observée, atteignant au cours de la 2^{ème} semaine un pic correspondant à l'expansion maximale (**Cmax**) in vivo des cellules modifiées. Ce phénomène est cohérent avec l'activation et la prolifération des CAR-T suite à leur rencontre avec les antigènes tumoraux.
2. **Une phase de décroissance progressive:** Après le pic d'expansion, les niveaux d'expression diminuent progressivement durant plusieurs semaines. Cette phase reflète la persistance des CAR-T dans l'organisme, un paramètre clé associé à leur efficacité thérapeutique.
3. **Une phase de décroissance multi-exponentielle:** À partir du troisième mois post-infusion, les niveaux d'expression chutent brutalement. Cette phase reflète le déclin des CAR-T dans l'organisme.

FIGURE 2. Évolution niveau d'expression des CAR-T



Évolution au fil du temps de l'expression normalisée des CAR-T par RTq-PCR. Cmax : expansion maximale des cellules CAR-T ; AUC : dynamique de l'expansion des CAR-T durant les 30 premiers jours post-infusion, T last : indicateur de la longévité des cellules dans l'organisme.

Ces résultats préliminaires sont en accord avec les cinétiques décrites dans la littérature par cytométrie en flux et par qPCR pour les thérapies CAR-T. Ils confirment également la pertinence de la RTq-PCR pour évaluer l'évolution temporelle de l'expression des CAR-T de manière quantitative. Les prochaines analyses (incluant un échantillon élargi de patients, des corrélations avec d'une part, les monitorings des CAR-T et des sous-types lymphocytaires par cytométrie en flux et d'autre part, avec la cinétique des niveaux cytokiniques plasmatiques) permettront d'affiner notre compréhension des mécanismes immunologiques sous-jacents et d'optimiser les stratégies de suivi.

L'ESPION QUI VENAIT DU FROID

Christine Pirlet, Corentin Streel, Arnaud Nevraumont, Youssra Khaouch, Véronique Deneys

Les établissements de santé doivent respecter des normes strictes en matière de conservation des produits sanguins. Ces normes ont été établies pour assurer la prévention des infections, le maintien de la viabilité et de la fonctionnalité cellulaire et la réduction des pertes de poches de sang.

En 2024, nous avons décidé de vérifier la conservation à bonne température, de 2 à 6°C, des concentrés de globules rouges (CGR) dans les services de soins intensifs et au quartier opératoire (QO). En effet, s'ils ne sont finalement pas transfusés, ces produits seront délivrés ultérieurement à d'autres patients et il est crucial de garantir leur sécurité.

L'évaluation de la température de conservation des CGR a été effectuée à l'aide de Timestrips, collés sur les poches, qui changent de couleur lorsque la limite supérieure de température est atteinte. Si cette limite est atteinte, les poches deviennent inutilisables.

Cette analyse a comporté plusieurs étapes (Figure 1):

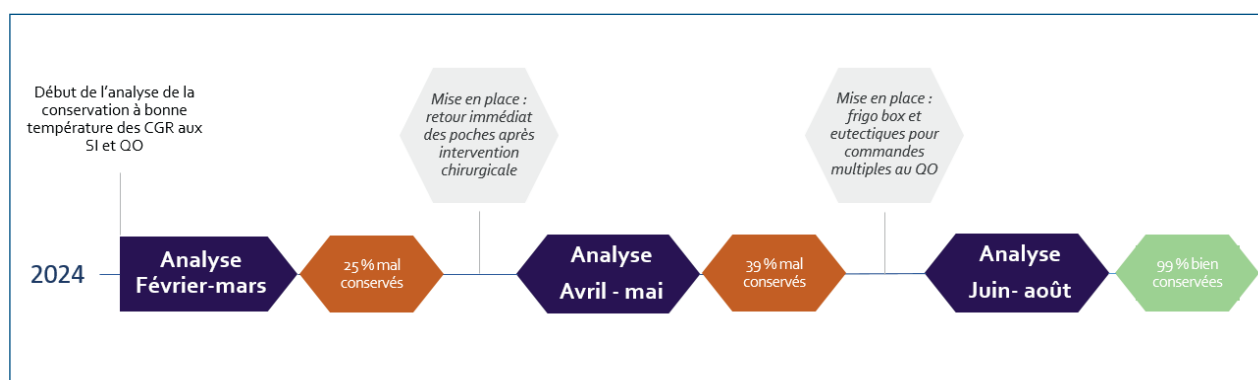
- Première période d'évaluation (février- mars) : 25% des CGR n'ont pas été conservés correctement. La plupart de ces poches ont été délivrées pour le quartier opéra-

toire mais ont été rapportées des soins intensifs. Ceci ne permet pas d'identifier où se situe le problème de conservation à bonne température. Nous avons mis en place une première mesure; les poches de CGR non utilisées au quartier opératoire sont ramenées directement à la banque de sang à la fin de l'intervention chirurgicale.

- Deuxième période d'analyse (avril et mai) : un problème majeur a été mis en évidence au QO puisque 39% des CGR y ont été mal conservés, ces poches provenaient de commandes multiples du QO. Notre action corrective a été de mettre en place l'utilisation d'un frigo box avec eutectiques pour tout transport de deux poches ou plus de CGR pour un même patient du QO.
- Troisième période d'évaluation, de juin à août : 99% des CGR revenus ont été conservés à bonne température.

Ces conditions optimales de conservation des CGR assurent maintenant la sécurité et l'efficacité des transfusions sanguines des patients suivants et permettent de réduire les pertes de poches de sang.

FIGURE 1. Etapes mises en place pour assurer la maîtrise des conditions de température des poches de concentrés de globules rouges (CGR) vers le quartier opératoire (QO)



QUAND L'HÉMOGRAMME DEVIENT PARTENAIRE DE LA SÉCURITÉ TRANSFUSIONNELLE

Youssra Khaouch, Véronique Deneys, Christine Pirlet, Marie-Astrid van Dievoet, Corentin Streeel

La transfusion est un acte de soin complexe caractérisé par différentes étapes avec plusieurs intervenants (1) et où la moindre erreur pourrait être fatale pour le patient (2). Garantir la sécurité transfusionnelle implique le respect strict des procédures mises en place au niveau de chaque maillon du processus. L'identification du patient constitue une étape essentielle pour garantir la sécurité du patient. Or, aujourd'hui, se tromper de patients ou mal identifier un échantillon sont les erreurs les plus fréquemment rapportées en hémovigilance. On estime actuellement ce risque à 1/2000 (3). A l'origine de ces erreurs d'identitovigilance, on retrouve les facteurs humains (fatigue, stress, interruptions de tâches, ...).

Un des moyens mis en place pour contrer cette problématique est la double détermination obligatoire (3). Celle-ci consiste à déterminer le groupe sanguin (GS) du patient sur deux échantillons différents, prélevés à deux moments différents, idéalement par deux préleveurs différents. La deuxième détermination de GS permet ainsi de valider la première et d'obtenir un GS dit « définitif ». Cette mesure permet de prévenir les erreurs de groupe ABO et d'éviter ainsi les accidents hémolytiques graves. Ce n'est que lorsque le groupe est déterminé à deux reprises qu'une transfusion en iso-groupe ABO peut être effectuée en toute sécurité. En pratique, on constate que cette mesure n'est pas infaillible puisque la procédure est malheureusement régulièrement contournée.

C'est pourquoi, pour déjouer la tentation de prélever les deux échantillons au même moment, nous avons mis en place l'ajout automatique d'une demande de GS pour tout nouveau patient hospitalisé dont le groupe n'est pas connu. Cet ajout est implémenté automatiquement en cas de demande d'un hémogramme et constitue la première détermination de GS. Ainsi, si le patient doit bénéficier plus tard d'une transfusion, il suffira de lui prélever un seul échantillon pour réaliser sa deuxième détermination de GS conformément aux mesures d'identitovigilance obligatoires

Le projet a été lancé le 04/11/2024 : après deux mois, l'ajout automatique a concerné 1635 échantillons, avec une moyenne de 17,5 prélèvements par jour. Au cours des deux premières semaines qui ont suivi l'implémentation en routine du projet, un état des lieux des difficultés et dysfonctionnements rencontrés a été réalisé afin de corriger et d'améliorer le processus conformément au modèle de Deming. La gestion partagée de l'échantillon entre les différents laboratoires a été le point critique sur lequel différentes actions correctives et préventives ont dû être mises en place. Le 18/11/2024, le projet était totalement intégré à la routine et en phase de stabilisation.

La réussite de ce projet est le fruit de la collaboration entre l'équipe de la Banque de Sang, le Laboratoire Central Automatisé (LCA), le Centre de Gestion des Laboratoires (CGL) et les informaticiens du Département Information et Systèmes (DIS) que nous remercions.

RÉFÉRENCES

1. Cagliano, AC, Grimaldi S, Rafele C. A structured approach to analyse logistics risks in the blood transfusion process. *Journal of Healthcare Risk Management*. 2021 ; 41(2): 18-30.
2. Najafpour, Z, et al. Preventing blood transfusion failures: FMEA, an effective assessment method. *BMC health services research*. 2017; 17: 1-9.
3. Deneys V, Pirlet C, Stoefs J, Khaouch Y, Rubin Winkler E, Streeel C. Sécurité transfusionnelle : quand on dit 2, c'est 2! *Louvain Med*. 2024; 143:486-497.