

UNIVERSITE Jean MONNET de SAINT ETIENNE

UFR de MEDEINE

MEMOIRE pour
l'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Claude LAMBERT

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Immunologie, CHU Saint-Etienne

Groupe d'études sur l'Immunité des Muqueuses et les Agents Pathogènes

EA 3064 / IFR 143 IFRESIS

Soutenance le 13 février 2008

Rapporteurs :

Professeur Marie-Christine BENE,	Laboratoire d'Immunologie,	Université de Nancy
Monsieur Patrice MARCHE,	Centre de Recherche U823	Université Grenoble
Professeur Frédéric BERARD,	Immunologie Clinique, U851	CHU Lyon Sud
	et Allergologie	

Examineurs :

Professeur Bruno POZZETTO,	Directeur GIMAP,	Université St Etienne
Professeur Didier BERNACHE,	Centre Ingénierie et Santé,	Ecole Nationale Supérieure
		des Mines St Etienne

Sommaire

1 - Introduction

2 - Curriculum vitae

- Tableau récapitulatif des encadrements de recherche

3 - Synthèse des travaux

1 – Diversité des Lymphocytes T

1.1 Validation et Standardisation de numération lymphocytaire en valeur absolue

1.2 Apports séméiologiques de la cytométrie

1.3 Caractérisation de sous populations non conventionnelles

Lymphocytes T CD4+ CD8dim.

Lymphocytes T CD4 dimCD8+

1.4 Artifices de marquages mimant des phénotypes inattendus

1.5 Variations de diversité des populations lymphocytaires

1.6 Approche théorique de la dynamique de population lymphocytaire

1.7 Réaction lymphocytaire T

Rejet d'allogreffe rénale

Immunité anti-tumorale

1.8 Biosécurité au cours de l'utilisation de la cytométrie en flux

2 – Détection de cellules tumorales dans des liquides biologiques

2.1 Protéomique :

2.2 Génomique

2.3 Immunodétection et immuno-analyse d'adénocarcinomes

2.4 Biotechnologie

3 – Diagnostic de l'allergie immédiate (venins d'hyménoptères ; médicaments)

4 – Suivi de marqueurs systémiques de réactions aiguës (choc septique, rejet d'allogreffe...)

5 – Autres études

4 - Travaux et publications:

- Articles dans des revues à comité de lecture,
- Tableau de répartition des travaux publiés en fonction de *l'impact factor*
- Contributions à des congrès (orales ou affichées)
- Ouvrages et les contributions à des ouvrages collectifs,
- Textes de vulgarisation ou de valorisation,
- Mémoires et thèses,

5 - Mémoires (Master2, Thèses) et Programmes nationaux et internationaux,

6 - Responsabilités locales, nationales et internationales.

7 - Enseignement.

8 - Publications représentatives.

9 - Perspectives.

Abréviations

- APC	Cellule présentatrice d'antigène
- CD	Cluster de différenciation
- CMF	Cytométrie en flux
- Cy	Cyanine
- DN	Lymphocyte T double négatif CD4-/ CD8-
- DP	Lymphocyte T double positif CD4+/ CD8+
- EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
- FITC	IsoThiocyanate de Fluorescéine,
- FRET	Fluorescence résonnante par transfert d'énergie
- FS	<i>Forward Scatter</i>
- HAART	<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
- HCV	Virus de l'hépatite C
- HIV	Virus de l'immuno-déficience humaine
- MHC	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- MGUS	<i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i>
- NK cell	Lymphocyte « <i>Natural Killer</i> »
- NKT cell	Lymphocyte T-NK
- OCUS	<i>Oligoclonal clonopathy of Undetermined Significance</i>
- p	Peptide
- p-MHC	Complexe peptide - MHC
- PE	Phycoérythrine
- PerCP	Protéine Périidine Chlorophyle
- SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
- T cell	Lymphocyte T (CD3+)
- T $\alpha\beta$ cell	Lymphocyte T exprimant le récepteur TCR $\alpha\beta$
- TCR	Récepteur de Cellule T
- T CD4dimCD8+ cell	Lymphocyte T CD8+ CD4diminué
- T CD4+CD8dim cell	Lymphocyte T CD4+ CD8diminué
- T CD8dim cell	Lymphocyte T exprimant un taux diminué de CD8
- T CD8 $\alpha\alpha$ cell	Lymphocyte T CD8 homodimère $\alpha\alpha$
- T $\gamma\delta$ cell	Lymphocyte T exprimant le récepteur TCR $\gamma\delta$
- TR	Rouge Texas

Figures

- Figure 1 :** Expression différentielle de CD45 membranaire sur les populations leucocytaires. Les lymphocytes expriment de fortes densités de CD45, surtout les T CD8+ comparés aux T CD4+ et NK ($p < 0.0001$).
- Figure 2 :** Expression différentielle de CD3 membranaire sur les différentes sous-populations lymphocytaires T. Les lymphocytes T CD8+ expriment moins de CD3 comparé aux T CD4+.
- Figure 3 :** Niveau d'expression des récepteurs membranaires en valeur absolue analysé par Quifikit sur 7 donneurs sains.
- Figure 4 :** Expression diminuée de CD4 (sur CD4+/CD4dim) et CD8 (sur CD8+ et CD8dim) comparée aux niveaux d'expression conventionnels.
- Figure 5 :** Nombre (cell/ μ L) de lymphocytes périphériques chez 97 donneurs de sang.
- Figure 6 :** Population lymphocytaire T non conventionnelle CD4+CD8dim (a). La distribution de CD8 est trimodale (b). Le nombre de cellules est groupé au-dessous de 20 cells/ μ l sauf pour quelques patients et contrôles sains (c, d). La population lymphocytaire peut être limitée à un seul clonotype V β (e).
- Figure 7 :** Population lymphocytaire T non conventionnelle CD4dimCD8+ (a). La distribution de CD4 est trimodale (b). Le nombre de cellules est groupé au-dessous de 20 cells/ μ l sauf pour quelques patients et contrôles sains (c). La population lymphocytaire peut être limitée à un seul clonotype V β (d).
- Figure 8 :** Artéfact de marquage par sensibilisation contre les fluorochromes, mimant un défaut de compensation ou des phénotypes atypiques. Quatre types de sensibilisation ont été observés : type 1 : anti-cyanine 7 ; type 2 : anti-cyanine 5 et cyanine 7 ; type 3 : anti-cyanine 5 avec réaction croisées pour Alexa ; type 4 : anti-phycoérythrine.
- Figure 9 :** Artéfact de marquages par interaction directe entre PE-Cy5 et Alexa (Alexa 467 et Alexa 750 testés). L'interaction dépend de la dose du fluorochrome et non de l'échantillon.
- Figure 10 :** Simulations mathématiques de la stimulation lymphocytaire T spécifique selon l'affinité du récepteur pour le peptide (agoniste, agoniste faible et antagoniste). Représentation des cinétiques de densités membranaires de récepteurs T et de la production d'Interleukine 2.
- Figure 11 :** Microbiocapteur pour la détection de cellules : vue montage optique.
- Figure 12 :** Les populations lymphocytaires T périphériques conventionnelles (CD4+ ou CD8+) sont hautement diverses et expriment tous les clonotypes V β (analyse sur 29 patients). La population T CD8+ est moins diverse que la population de cellules T CD4+.

1 - Introduction

Dès l'ouverture du laboratoire et la création de cette activité sur le CHU en 1995, notre travail a été centré autour de l'analyse cellulaire. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux populations lymphocytaires T et aux adénocarcinomes avec deux aspects particuliers : diversité et dynamique de populations hétérogènes, détection et caractérisation d'éléments minoritaires (événements rares) au sein de cette population.

Notre activité hospitalière a été effectuée dans au **laboratoire d'Immunologie** qui fait partie du Pôle de Biologie-Pathologie du CHU de Saint-Etienne. La partie plus expérimentale ou biotechnologique de nos recherches a été conduite dans le cadre du Groupe d'études sur l'Immunité des Muqueuses et les Agents Pathogènes (**GIMAP**, EA 3064) et, depuis 2004, dans celui du Centre d'Ingénierie et Santé de **l'Ecole Nationale Supérieure des Mines** de Saint Etienne (où nous sommes détaché pour 20% de notre temps hospitalier).

1 - Pour les populations lymphocytaires, nous avons développé et standardisé des méthodes d'analyses destinées à des applications cliniques. Profitant du fait que nous avons été l'un des premiers laboratoires d'analyses médicales qui fût équipé d'un instrument de nouvelle génération, nous avons également contribué à décrire plus précisément la **séméiologie des données cytométriques**. Cette maîtrise technologique nous a permis de former de nombreux stagiaires, étudiants et biologistes dans ce domaine d'excellence.

Ces analyses sémiologiques nous ont conduit à décrire des sous-populations non conventionnelles, potentiellement pathologiques (**Oligoclonal Clonopathy of Undetermined Significance**). Nous avons également mis en évidence **d'autres sous-populations** qui ont probablement des significations fonctionnelles et cliniques puisqu'elles varient considérablement dans les échantillons que nous analysons habituellement. Par ailleurs, nous avons identifié chez certains patients, des **phénomènes artéfactuels**, qui peuvent être source de mauvaise interprétation des résultats. Ces artéfacts pourrait être liés à une sensibilisation contre certains fluorochromes, ce qui paraît surprenant car ces molécules ne sont pas présentes dans l'environnement. La signification clinique de ces sensibilisations reste à préciser.

Nous avons cherché à mieux caractériser la dynamique de population en élaborant une analyse théorique des comportements individuels (clonaux) par le biais d'un **modèle mathématique** qui

est en cours de validation expérimentale. Ce modèle devrait permettre de simuler des situations pathologiques ou des interventions thérapeutiques et éventuellement en anticiper voir optimiser les résultats.

2 - Nous avons également développé des techniques cytométriques pour la caractérisation de cellules tumorales (en se limitant aux **adénocarcinomes**), en suspension dans des liquides biologiques (épanchements pleuraux, liquides d'ascite...) ou après dissociation de tumeurs. Nous avons mis au point de nouveaux outils biologiques de protéomique, de génomique fonctionnelle et biotechnologiques (traitement de données d'électrophorèse bi-dimensionnelle, développement d'un nouveau **concept instrumental**) pour apporter des aides diagnostiques. En effet, les méthodes **cytométriques** apportent des informations bien plus précises que les techniques actuelles pour la caractérisation multiparamétrique de cellules tumorales, l'évaluation de leur degré de dé-différentiation, leur propension à migrer, la réponse au traitement (maladie résiduelle) ou la présence de cellules circulantes.

3 - Nous avons participé activement au développement et à la standardisation de tests diagnostiques d'**allergie** immédiate (IgE dépendante) ou retardée (lymphocytaire T). Nous avons participé à des protocoles nationaux pour le dépistage d'allergies aux médicaments. Nous avons développé un test cytométrique **d'activation in vitro des basophiles**, autres cellules rares dans le sang circulant. Nous mettons en place collaboration européenne sur ce thème.

4 - Enfin, nous avons développé des stratégies de surveillance biologique de réactions immunitaires aiguës comme le choc septique ou le rejet d'allogreffe, par la mesure de cytokines ou de protéines de la phase aiguë comme la Procalcitonine.

Nous avons conçu plusieurs projets détaillés dans ce rapport qui ont été financés au niveau régional, par le Ministère de la santé (projet de recherche clinique), la Ligue contre le Cancer (comité de la Loire) ou l'Institut National du Cancer.

Nous avons encadré scientifiquement plusieurs étudiants dans le cadre de leur formation de techniciens, de thèses d'exercice de médecine, de DEA/master, de diplômes d'ingénieur en biologie (INSA ; EPHE) et surtout de thèses de sciences (6 thèses soutenues ; 2 thèses en cours).

Nous avons participé à l'enseignement du Master I Biologie fonctionnelle, Biophotonique (Module « Physiopathologie des Maladies Transmissibles ») et de Biotechnologie (Centre Ingénierie et Santé) à l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

2 - Curriculum vitae

Etat civil

LAMBERT Claude

Né le : 16 avril 1956 à Chambéry (Savoie, France)

Nationalité : Français

Marié, 3 enfants (25, 23, 21 ans)

Adresse Professionnelle

Laboratoire d'Immunologie

Pole de Biologie-Pathologie

Plateau de biologie, Hopital Nord

CHU St Etienne,

F42055 St ETIENNE Cedex 2, FRANCE

tel : (33) 477 12 05 13

Diplômes

Docteur en Médecine	1986, Université de Grenoble,
Certificat en Néphrologie	1987, Université de Grenoble,
PH Immunologie biologique	1994, CHU St Etienne,
DEA transplantation	1995 Université de Dijon
Docteur en Sciences de la Vie	2005, Université de St Etienne

Titres

1985-1987	Interne en médecine	Hôpital Général d'Annecy, France (services de néphrologie, hématologie, cancérologie)
1987-1988	Research Assistant	Centre d'Immunologie de l'OMS, Université de Genève, Suisse
1988-1991	Research fellow	University College of London; UK
1991-1995	Praticien à titre provisoire	CHU St Etienne Service de néphrologie, dialyse et transplantation

Depuis 1995 ————— **Praticien Hospitalier** ————— **CHU de St Etienne**
Laboratoire d'Immunologie

Groupe d'études de l'Immunité des Muqueuses et les Agents Pathogènes (GIMAP)

EA 3064, Faculté de Médecine, Université Jean Monnet

Enseignant-Chercheur associé, Centre Ingénierie et Santé (CIS),

Equipe « Dynamique des Systèmes Biologiques »; UMR CNRS 5148

Ecole Nationale Supérieure des Mines de St Etienne

Intérêts scientifiques principaux

Projets de recherche centrés sur la **Cytométrie et les Biotechnologies en Immunologie et Immuno-Cancérologie**

- 1 - Diversité des lymphocytes T
 - Exploration clinique ; immunomonitoring (sémiologie, technologies...)
 - Diversité, répertoire (sang, tissus, tumeurs...)
 - Dynamique de populations (modèle mathématique, modèle d'activation...)
- 2 - Adénocarcinomes (protéomique, génomique, immunodétection, instrumentation)
- 3 - Allergie : diagnostic ; réactions croisées, tests cellulaires in vitro
- 4 - Effecteurs systémiques (choc septique, inflammation chronique, rejet d'allogreffe).

Activités d'enseignement

Immunologie: Master I Biologie fonctionnelle et Biophotonique :

Module « Physiopathologie des Maladies Transmissibles »

Biotechnologie au Centre Ingénierie et Santé

Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.

Cytométrie: phénotypage, tests fonctionnels; assurance qualité

Organisation d'ateliers, de journées thématiques et de congrès *sous l'égide de l'Association Française de Cytométrie*

Biologie moléculaire:

Formation permanente annuelle depuis 2000 pour étudiants et techniciens CHU

Au plan national :

Société Française d'Immunologie (SFI)	depuis 1990
Association Française de Cytométrie (AFC)	depuis 1997
Membre du Conseil d'administration depuis 2004	
Société Rhône-Alpes d'Immuno-Allergologie (SORAIA)	depuis 1999
Association Nationale de Formation Continue en Allergologie	depuis 1999
Club Francophone des cellules Dendritiques (CFCD)	depuis 2005

Au plan international :

European Macrophage Society (EMDS)	depuis 1999
International Society of Analytical Cytometry (ISAC)	depuis 2004
Membre du comité international de sécurité biologique en cytométrie 2004-2007	
Clinical Cytometry Society (CCS)	depuis 2004
European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) (membre du comité d'organisation du congrès européen de 2008 à Brème)	depuis 2007
Groupe Européen pour la standardisation des tests d'activation des basophiles (€BAT) (membre co-fondateur)	depuis 2007

Engagements communautaires:

Conseil scientifique de l'IFR 143 IFRESIS
Conseil d'Administration de l'AFC (élu en octobre 2003, trésorier depuis 2004)
Comité de Direction du Centre Ingénierie et Santé
Commission Médicale d'Etablissement (CME) du CHU de Saint-Etienne
Bureau du Pole Biologie-pathologie du CHU de Saint-Etienne
Délégation Régionale de Recherche Clinique et d'Innovation de la Loire (DRRCI)
Sous-commission de soutien aux techniques innovantes et coûteuses du CHU de Saint-Etienne (STIC)
Groupe de travail pour l'informatisation des Laboratoires du CHU de Saint-Etienne
Commission Médicale d'Etablissement de l'Institut de Cancérologie de la Loire

eBioexpert : consultation, support technique en cytométrie et immunologie

CLARO Scientific : détection multispectrale de cellules en suspension

bioMerieux (Lyon France) : protéomique, immuno-cancérologie

Beckman-Coulter : cytométrie en flux, immunodosages

BD Biosciences : cytométrie en flux (clinique),

Brahms : intérêt diagnostique du dosage de la Procalcitonine comme marqueur d'infection

DPC : dosages de cytokines (intérêt dans les infections graves et le choc septique)

Tableau récapitulatif d'encadrements de recherche

Années	Publications dans revues et ouvrages	Communication s orales	Textes de valorisation	Co-direction de thèse	co-encadrement de thèse	Encadrement diplôme ingénieur	Encadrement de DEA ou Master
1997			1				Rancon
1998	2	2	1				Contet
1999	1					Volattier	Blanc
2000	5	1			Li		
2001	1				Herbeuval		
2002	1			Passebosc			
2003	5			Bidot	Vedrine		
2004	4	4		Iobagiu			
2005	11	2		Bernard			
2006	2	3				Stachowicz	Casu, Mohammed
2007	2	1		El Hentati			Mahdi Montmartin
2008	1						

3 - Synthèse des travaux

L'essentiel de nos travaux a porté sur l'analyse et la caractérisation (cytomique) de cellules. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux phénotypes non conventionnels. Nous avons cherché à **développer et standardiser des méthodologies** pour **caractériser**, suivre et mieux connaître le comportement de sous-groupes cellulaires minoritaires dans des populations complexes. Nous avons abordé les aspects biologiques pour chercher leur signification physiopathologique éventuelle. Nous avons également une activité de développement biotechnologique, dédié à l'immunologie (immunité innée et cognitive ; allergie) et l'immunocancérologie.

1 – Analyse des populations lymphocytaires T

Les lymphocytes T sont des populations très complexes, composées de plus de 10^9 spécificités différentes dans un organisme humain, à des stades de maturité ou de réactivité différents.

La simple numération de ces populations, même de ses deux sous-types principaux (T CD4+ et T CD8+), test immunologique cellulaire le plus fréquemment demandé, n'a donc pas vraiment de sens du point de vue de la surveillance de la capacité de réponse immunitaire en dehors de phénomènes de toxicité globale (congénitale, iatrogène ou virale). De nombreuses pathologies immunitaires sont encore mal caractérisées et manquent de marqueurs diagnostiques ou pronostiques pour le suivi et le traitement des patients.

Les méthodes technologiques actuelles permettent d'obtenir des informations plus précises, très couramment utilisées en recherche fondamentale, jamais en clinique. La cytométrie en flux, quantitative multiparamétrique permet d'identifier jusqu'à 16 sous-populations par le jeu de combinaisons de marqueurs. Ces sous-populations ne sont jamais considérées en immunologie clinique et leur pertinence clinique n'est pas évaluée.

1.1 Validation et Standardisation de numération lymphocytaire en valeur absolue

Nous avons donc cherché à améliorer la caractérisation des populations lymphocytaires dans différents contextes cliniques.

L'importance du suivi de la numération des lymphocytes T dans le SIDA a incité à une standardisation de la technique pour permettre une bonne précision et reproductibilité, dans le temps et entre laboratoires, notamment en valeurs absolues. Des programmes de contrôle de qualité internationaux l'attestent (AFSSAPS, UK-NEQASTM et autres).

Analyser une population aussi complexe avec seulement deux à trois paramètres (lymphocytes T CD4⁺ ou T CD8⁺) paraît donc extrêmement réducteur et peut expliquer le manque d'intérêt des cliniciens pour cette analyse, même dans les pathologies qui font clairement intervenir des lymphocytes T comme les maladies auto-immunes, les infections virales chroniques ou encore les hypersensibilités (eczémas, asthme...).

Nous avons montré la qualité et les performances de la technique de numération des lymphocytes T en 4 couleurs sur notre premier système (EPICS XLM® Beckmann-Coulter - **1998.2**-) puis sur le nouveau système FACSCanto (BD Biosciences -**2006.1** -). Les deux techniques se sont montrées robustes et reproductibles. Une pratique très rigoureuse permet d'obtenir des coefficients de variabilité inférieurs à 10% et une bonne reproductibilité dans le temps. Nous avons montré que les procédures proposées pour FACSCanto donnaient des résultats légèrement décalés avec notre ancien système EPICS XLM® et avec les contrôles internationaux. De plus, les informations fournies manquaient de précision. Nous avons donc proposé d'utiliser une méthode plus précise, plus sûre et plus proche des recommandations internationales. Nous avons ainsi obtenu une bonne continuité des résultats pour le suivi des patients.

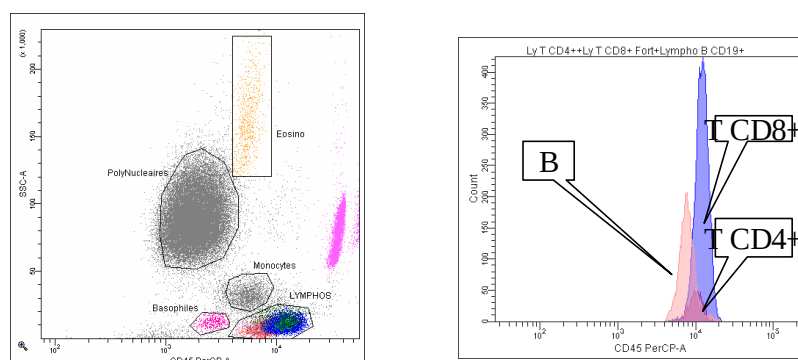
1.2 Séméiologie en cytométrie en flux

L'observation fine des aspects des niveaux de fluorescence des différentes populations leucocytaires, dans des conditions très standardisées, permet de noter des différences qui peuvent aider à l'identification des populations.

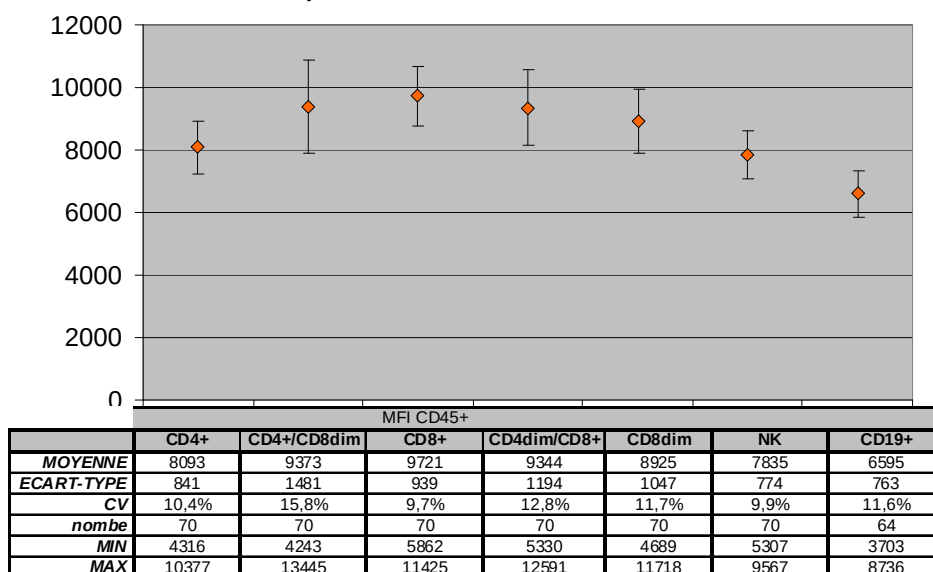
Niveaux d'expression de CD45

En considérant les variations d'intensité de fluorescence, l'analyse des résultats graphiques nous a permis de visualiser différentes populations leucocytaires selon le niveau d'expression de CD45: polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, monocytes et lymphocytes (fig 1). L'expression de CD45 diffère selon le type lymphocytaire : réduite sur des lymphocytes B normaux (moyenne MdFI : 6595 ± 763) comparée à celle des lymphocytes T matures T ($p = 2.9 \cdot 10^{-35}$). Dans une étude sur 71 donneurs en bonne santé (**2008.3**), nous avons observé que le CD45 était plus élevé sur les lymphocytes T CD8+ (MFI 9721 ± 939) que sur les lymphocytes T CD4+ (MFI 8093 ± 841) et sur les cellules NK (MFI 7835 ± 774).

Figure 1 : Expression différentielle de CD45 membranaire sur les populations leucocytaires, chez 70 donneurs de sang. Les leukocytes expriment différentes densités de CD45, plus élevé sur les lymphocytes T CD8+ que sur les T CD4+ et les NK ($p < 0.0001$).



Moyennes de fluorescence de CD45 PerCP

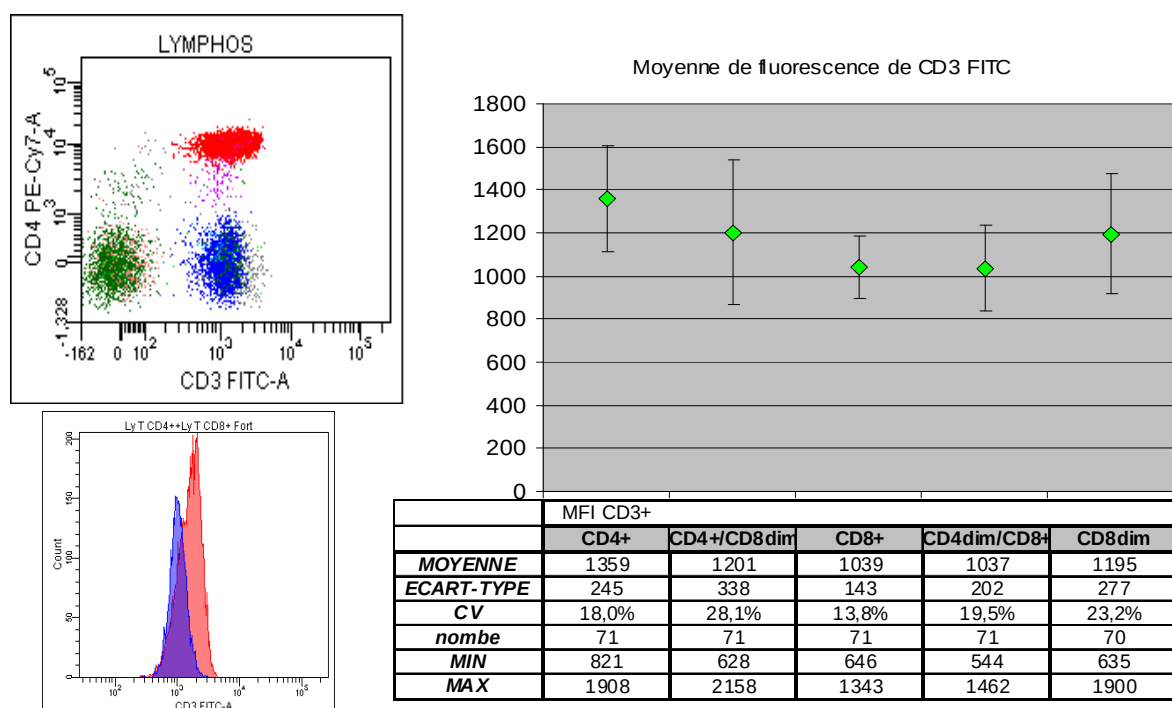


Niveaux d'expression de CD3

La distribution de CD3 est très homogène (courbe gaussienne) mais peut revêtir un aspect bimodal. Nous avons démontré, en accord avec d'autres, que les lymphocytes T $\gamma\delta$ (**2004.1**) exprimaient un taux élevé de CD3. Ce simple critère permet de noter les augmentations de populations T $\gamma\delta$ chez les patients.

Dans une étude sur 71 donneurs en bonne santé nous avons observé que les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8 exprimaient des taux de CD3 inférieurs (MFI : 1039 ± 143) aux lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4+ (MFI : 1359 ± 245 ; $p < 0.0001$ -fig 2-). Le CD3 était nettement augmenté (MFI 2540^{+340}) sur la population T $\gamma\delta$ ($p < 0.0001$ -**2006.1**, **2008.3**-). Cette information permet de mieux identifier les T $\gamma\delta$ qui n'expriment jamais le CD4 mais peuvent exprimer le CD8. Les différences d'expression de CD3 sont plus visibles sur les lymphocytes T CD4 négatifs.

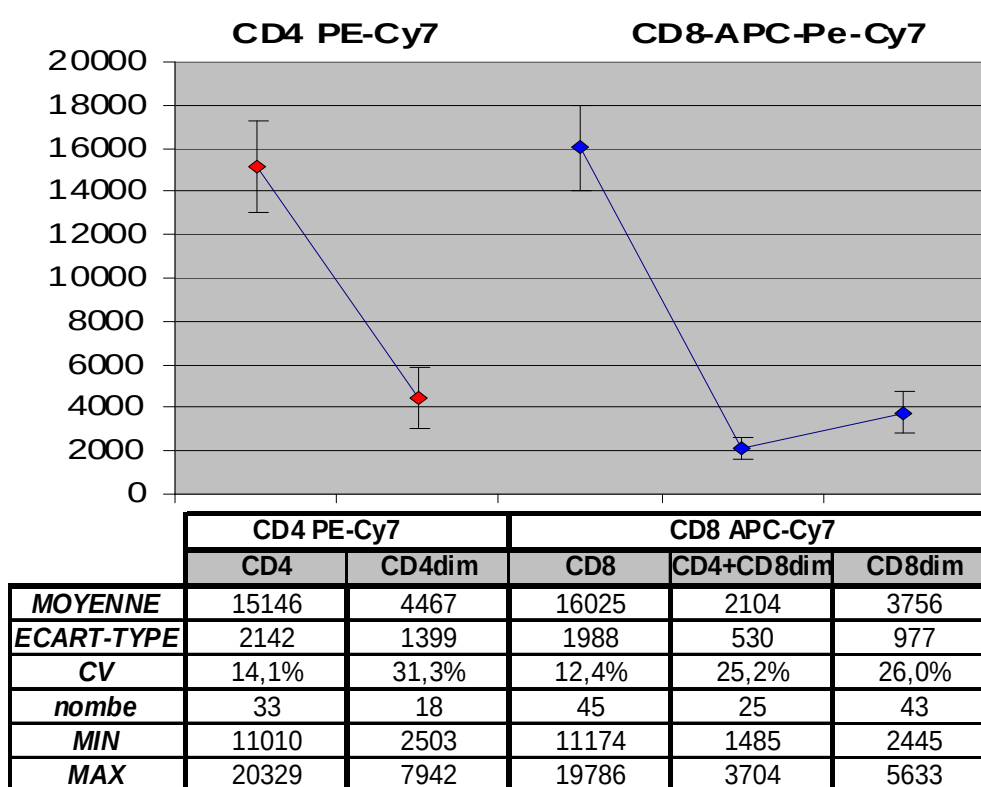
Figure 2 : Expression différentielle de CD3 membranaire sur les différentes sous-populations lymphocytaires T chez 71 donneurs de sang. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8+ expriment moins le marqueur CD3 que les lymphocytes T CD4+.



Niveau d'expression des co-récepteurs CD4 et CD8

La densité d'expression des molécules CD4 et CD8 est très homogène entre échantillons pour un même type de marquage (i.e.: système FacsCanto). Cependant, nous avons observé (**2006.1** fig. 3) qu'une minorité de chaque sous-population T CD4 et T CD8 peut exprimer des niveaux significativement plus faibles de leur co-récepteur respectif (MFI CD4 : 4467^{+1399} et CD8 : 2104^{+530}) comparés aux niveaux d'expression conventionnelle (MFI CD4 : 15146^{+2142} et CD8 : 16025^{+1988}) sur une série de 45 analyses consécutives chez des patients transplantés rénaux. La représentation des sous-populations qui expriment un faible niveau de récepteur est très variable d'un patient à l'autre (de 0,1 à 20% des lymphocytes).

Figure 3 : Expressions diminuées de CD4 (sur population « CD4dim ») et CD8 (sur populations « CD4+CD8dim » et « CD8dim ») comparées aux niveaux d'expression conventionnelle (populations T CD4 et T CD8) sur une série de 45 analyses consécutives de routine chez des patients transplantés rénaux.

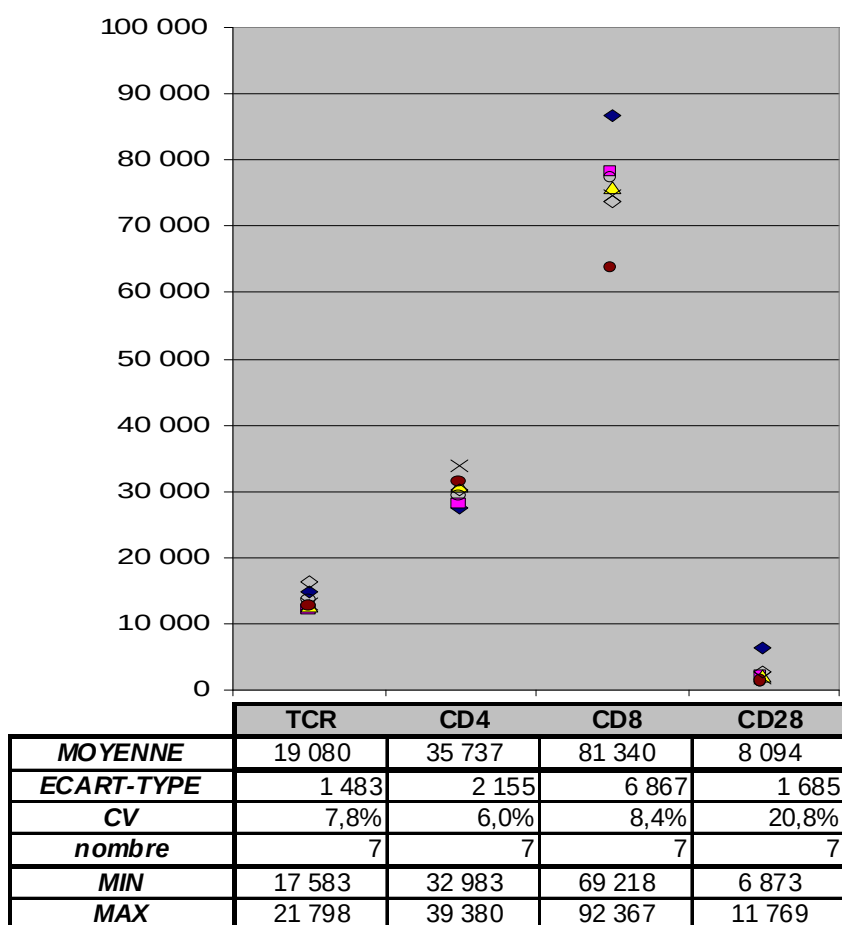


Quantification de la densité des récepteurs membranaires

Par méthode de quantification indirecte avec calibration (Quifikit™), nous avons pu évaluer les densités de surface des molécules considérées (fig. 4). Nous observons des taux comparables à la littérature avec de grandes différences entre les protéines analysées (2008.3; Thèse Fatima-Zahra El HENTATI).

Les taux sont très différents d'un récepteur à l'autre. Ces mesures nous permettront d'abonder les données quantitatives précises du modèle mathématique.

Figure 4 : Niveaux d'expression des récepteurs membranaires en valeurs absolues (molécules / cellules) analysés par Quifikit sur 7 donneurs sains.



Autres sous-populations lymphocytaires

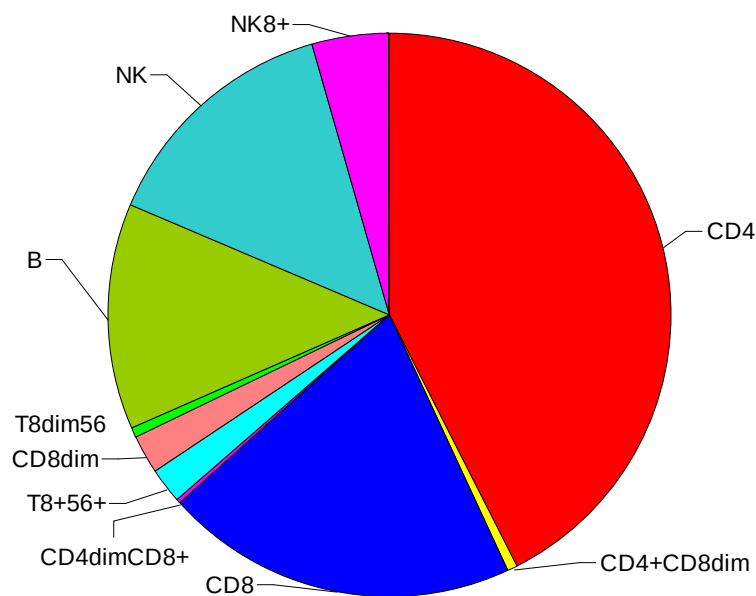
D'autres sous populations peuvent être définies selon le niveau et la combinaison d'expression de CD3, CD4, CD8 et CD56 (**2006.1**). Dans une étude chez 71 donneurs de sang La répartition de ces sous-populations a été évaluée chez 71 donneurs de sang (fig 5).

Figure 5 : Répartition des sous-populations (cell/ μ L) de lymphocytes périphériques chez 71 donneurs de sang.

a)

numéro	CD3/ μ L	CD4	CD4+CD8 dim	CD8	CD4dim CD8+	T8+56+	CD8dim	T8dim56	B	NK	NK8+
moyenne	1826	1120	15	529	11	51	53	17	342	372	120
ecart type	570	343	20	235	14	46	30	15	171	185	65
min	815	467	1	147	1	4	11	2	101	96	19
max	4426	2436	152	1634	87	248	180	93	1186	1112	310

b)



Lymphocytes T CD8dim

Il existe d'authentiques lymphocytes T CD8⁺ qui n'expriment pas CD4 et expriment CD8 en intensité faible (**2004.1**, **2006.1**). Le récepteur CD8 est de forme homodimérique (CD8αα) et correspond en fait à une partie des lymphocytes T CD8αα dont la majorité exprime CD8α à intensité habituelle (**2008.5**). Ils sont matures, non activés et peuvent être restreints en clonotype. Ils peuvent exprimer le récepteur CD56 qui reflète une fonction cytotoxique.

Leur rôle physio-pathologique n'est pas encore élucidé. Une baisse d'expression de CD8 pourrait modifier l'avidité du lymphocyte pour son peptide, ce qui sera discuté plus tard. La présence de CD56 est généralement synonyme d'activité cytotoxique. Le rôle de CD8 sur les cellules NK n'est pas connu mais il existe plusieurs formes intermédiaires (normales ou tumorales) entre les cellules NK et les cellules T comme par exemple les cellules T.NK. Ces populations n'ont pas pu être caractérisées dans la présente étude.

Lymphocytes T CD8CD56+

Une fraction (très variable entre patients) de lymphocytes T exprime le marqueur CD56. Ils sont toujours de type T CD8⁺ (fig: 5). Ces lymphocytes pourraient avoir une fonction cytotoxique. Ils sont facilement identifiables et quantifiables en cytométrie 5/6 couleurs (**2006.1**) et devraient faire l'objet d'études cliniques pour en définir la signification clinique.

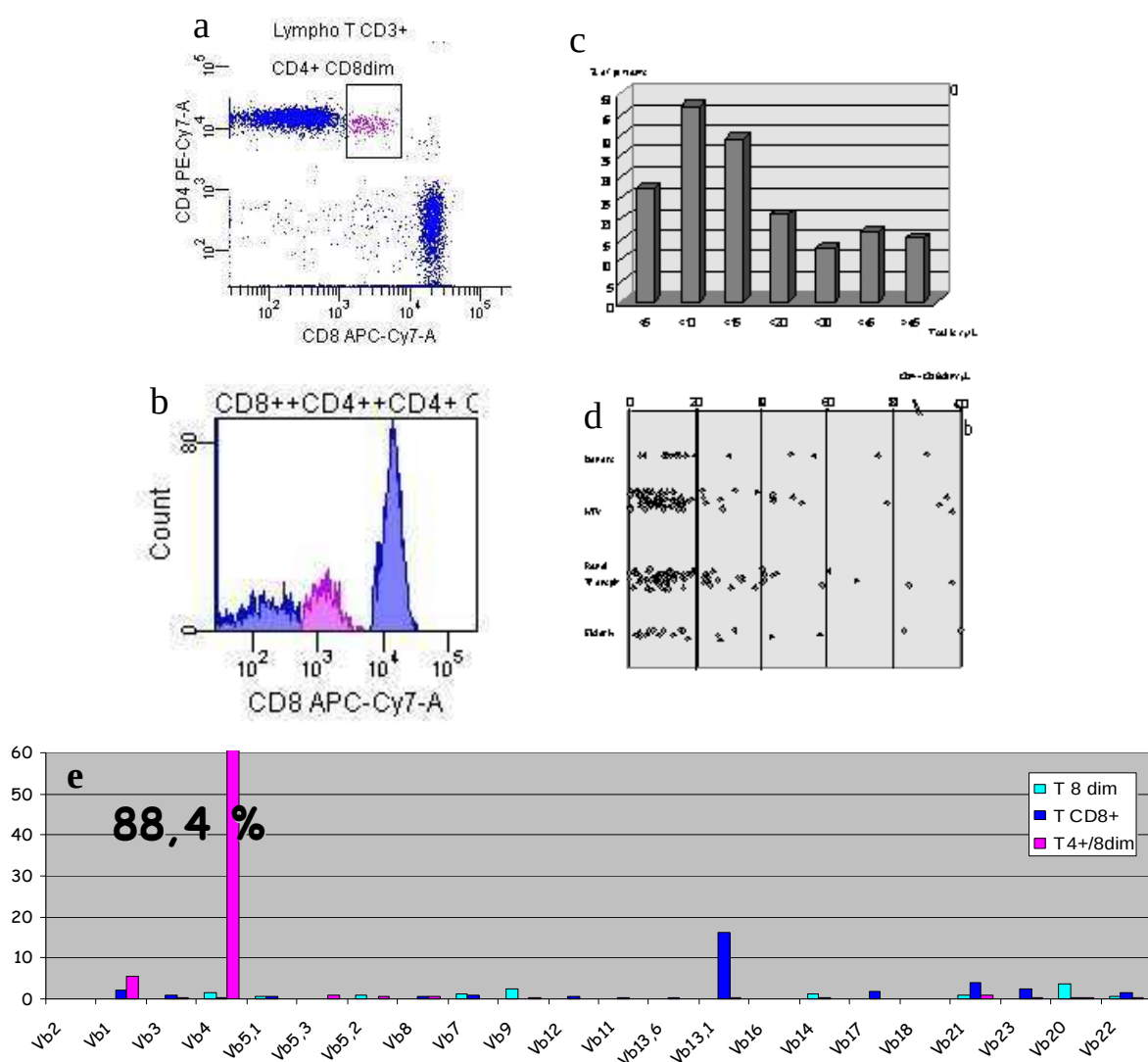
1.3 Caractérisation de sous-populations lymphocytaires T non conventionnelles

L'analyse quotidienne des lymphocytes périphériques humains par cytométrie en flux multicolore (4 à 6 couleurs) et en suivant les procédures de standardisation permet d'observer de façon hautement reproductible des sous-populations lymphocytaires T autres que les deux populations conventionnelles T CD4⁺ et T CD8⁺, en tenant compte de l'intensité de fluorescence de chaque marqueur et de leurs différentes combinaisons.

Lymphocytes T CD4+ CD8dim

Chez certains patients, nous avons pu remarquer) un double pic (fig 6b) de distribution d'intensité de fluorescence de CD8 sur les lymphocytes T (**2005.5 ; 2006.1**). Le pic supplémentaire correspondait à une très nette diminution de l'intensité de fluorescence (médian 5.0 ± 4.1) comparée aux lymphocytes T conventionnels (24.8 ± 5.4). En valeur absolue, cela correspondait à une diminution de la densité de surface des molécules CD8 qui étaient comprise entre 11 000 et 17 000 par cellule sur les lymphocytes à faible CD8 versus 96 000 à 128 000 par lymphocyte conventionnel). Ces lymphocytes T expriment également CD4, à intensité comparable aux lymphocytes T CD4 conventionnels et sont subséquemment nommés lymphocytes T CD4+ CD8dim (fig 6).

Figure 6 : Population lymphocytaire T non conventionnelle CD4+CD8dim (a). La distribution de CD8 est trimodale (b). Le nombre de cellules est groupé au-dessous de 20 cells/ μ l sauf pour quelques patients et contrôles sains (c, d). La population lymphocytaire peut être limitée à un seul clonotype V β (e).



La population non conventionnelle est clairement individualisée chez 8 des 31 donneurs de sang testés (25.8%) et avec des valeurs supérieures à 20 cell/ μ L et chez 38 des 156 patients séropositifs pour VIH (19.2%) ou transplantés rénaux testés (29.5%), avec des taux d'expression qui variaient de 2 à 155 cellules par μ l, la majorité (77%) ayant moins de 20 cellules par μ l).

Les cellules T CD4⁺CD8^{dim} n'expriment pas de marqueur précoce d'activation lymphocytaire (CD69, CD25). Tous ces lymphocytes expriment l'isoforme $\alpha\beta$ de TCR et l'isoforme homodimérique CD8 $\alpha\alpha$. Chez 26 des 29 patients, nous avons pu observer la prédominance monoclonale d'une chaîne V β (de 18 à 94% des lymphocytes T CD4⁺CD8^{dim}). Dans les trois autres cas, nous avons observé un "trou phénotypique" avec une somme des nombres de chaînes V β observées inférieure à 20%, suggérant qu'une des chaînes non testées est largement prédominante.

La signification immunologique de ces cellules dans le sang périphérique n'est pas encore clairement élucidée. Il est possible que la restriction à un clonotype puisse être due à une stimulation prolongée par un peptide très spécifique ou, moins probablement, par un super antigène commun à un isotype V β .

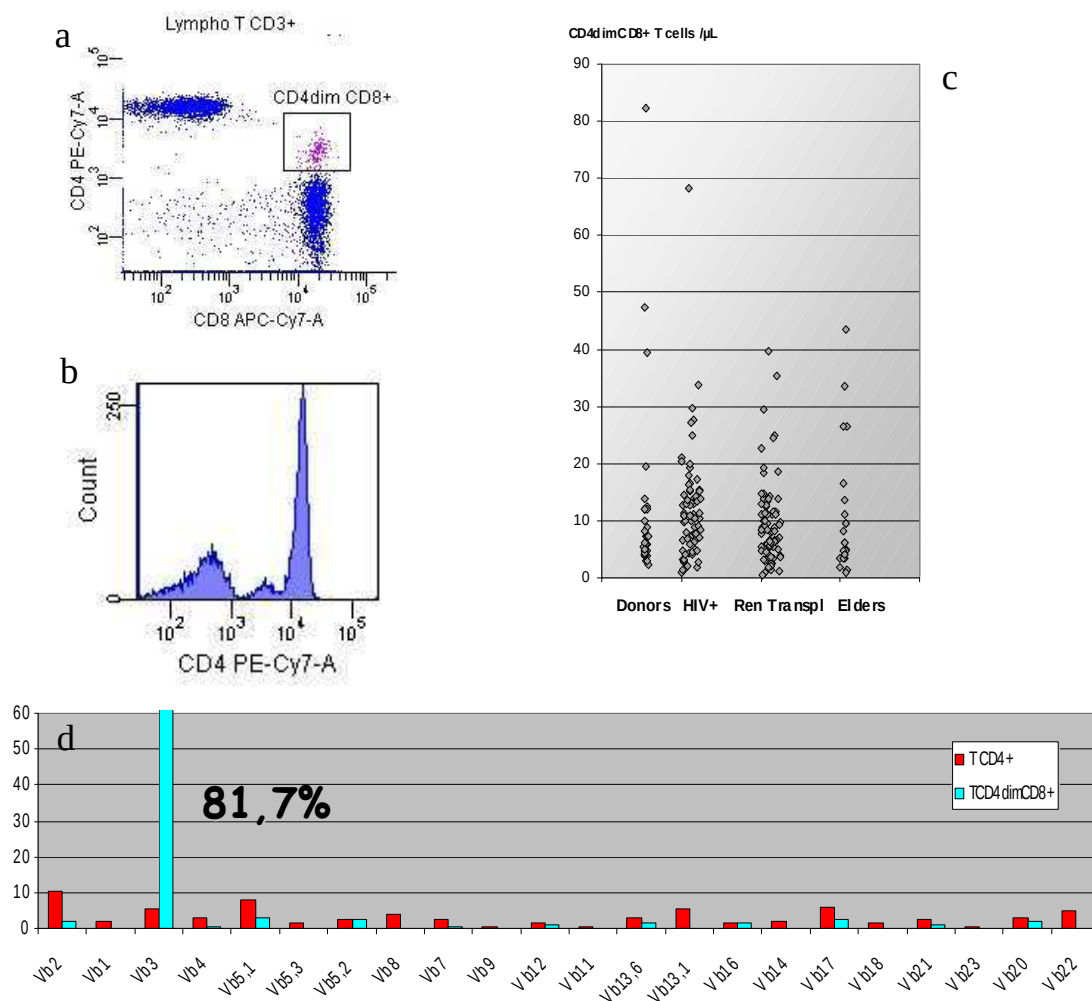
Par analogie au syndrome de dysglobulinémie monoclonale de signification indéterminée, nous émettons l'hypothèse qu'une partie au moins de ces fractions lymphocytaires puisse éventuellement évoluer vers un syndrome lympho-prolifératif à plus ou moins long terme. Nous avons proposé de nommer cette entité "clonopathie oligoclonale de signification indéterminée" (**OCUS**). Nous avons choisi le terme oligoclonal car la prépondérance d'une chaîne V β ne suffit pas pour affirmer la monoclonalité vraie que nous souhaitons pouvoir confirmer par l'étude des transcrits. Le terme clonopathie a été également discuté car aucune signification pathologique clinique n'a encore été associée à ce phénomène. Dans l'état actuel de nos connaissances, il nous paraît souhaitable de suivre l'évolution de cette entité chez les patients.

Lymphocytes T CD4^{dim}CD8⁺

Au cours d'une étude équivalente, nous avons rapporté l'existence d'un contingent lymphocytaire T (CD3 positif) exprimant CD4 à faible intensité. Cette éventualité doit évidemment être différenciée de la présence de monocytes qui expriment CD4 à faible intensité, mais n'expriment pas CD3 (**2005.3**). La diminution d'expression de CD4 est très significative puisqu'elle équivaut à une moyenne de fluorescence de 10.1 ± 3.5 comparée à 24.8 ± 5.4 pour les

lymphocytes T CD4 conventionnels. Ces lymphocytes T CD4dim expriment toujours CD8 à taux normal et l'isoforme hétéro-dimérique (CD8 $\alpha\beta$).

Figure 7 : Population lymphocytaire T non conventionnelle CD4dimCD8⁺ (a). La distribution de CD4 est trimodale (b). Le nombre de cellules est groupé au-dessous de 20 cellules/ μ l sauf pour quelques patients et contrôles sains (c). La population lymphocytaire peut être limitée à un seul clonotype V β (d).



La présence de cette population est beaucoup moins fréquente que la population précédemment étudiée. La majorité des échantillons avait moins de 20 cellules CD8⁺ CD4dim par microlitre (fig 7). Cependant, 3 des 31 donneurs de sang testés (9.7 %) avaient une valeur supérieure à 20 cell/ μ L. Nous avons observé ces cellules chez 8 des 78 patients séropositifs pour VIH⁺ (11 %) et 6 des 78 patients greffés rénaux testés (7.9 %). La présence de cette sous-population était légèrement augmentée chez les patients de plus de 70 ans (4 sur 21 soit 19%).

Comme pour les lymphocytes T CD4+CD8dim, les lymphocytes T CD8+ CD4dim ne présentent pas de signes d'activation (CD69 ; CD25). Parmi 13 patients testés, tous avaient une prépondérance monoclonale qui représentait 40 à 94 % des cellules. Les clonotypes prépondérants étaient généralement différents d'un patient à l'autre.

1.4 Artifices de marquages mimant des phénotypes inattendus

Les techniques d'immunophénotypages, pour objectif et robuste qu'elles soient, ont des limites qui peuvent mener à des erreurs. L'utilisation simultanée d'un grand nombre de fluorochromes dans le même tube nous a amené à observer des artefacts de marquage qui peuvent entraîner une confusion pour la définition des sous-populations.

Artéfacts par interférence entre le sérum et certains fluorochromes

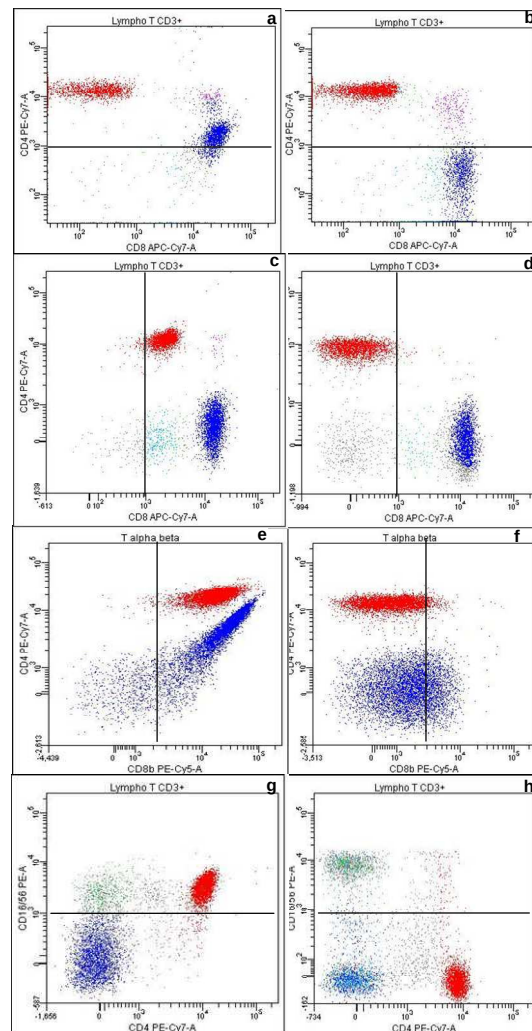
En routine hospitalière, nous utilisons de préférence des marquages sur sang total avec érythrolyse des globules rouges. Dans ce cas, nous avons observé chez quelques patients des anomalies de marquage sous forme de populations exprimant deux marqueurs mutuellement exclusifs dans des conditions physiologiques (2007.1 ; 2008.2). Ces résultats suggéraient soit un défaut de réglage du cytomètre (compensations de fluorescence) soit la présence de populations leucémiques.

Nous avons montré que l'effet était dû à un facteur soluble, présent dans le plasma ou le sérum. Le marquage des cellules lavées retrouvait une allure habituelle. La spécificité et la bivalence de ces artefacts suggèrent le rôle d'anticorps mais nous n'avons pas pu montrer clairement la présence d'une sensibilisation anti-fluorochrome (IgG, IgA ou IgM). La cause et les conséquences pathogéniques de ces facteurs solubles ne sont pas connues. Mais leur fréquence semble plus élevée chez des patients qui ont des troubles immunitaires.

Nous avons identifiés plusieurs types distincts d'interférence (figure 8) :

- 1 – association de deux tandems comprenant une cyanine 7
- 2 – association de deux tandems comprenant une cyanine 5 et une cyanine 7
- 3 – association d'un tandem comprenant la cyanine 5 et un alexa
- 4 – association d'une phycoérythrine avec un tandem comprenant une phycoérythrine (PE-Cy5 ou PE-Cy7)

Figure 8 : Artéfact de marquage par interférence du sang total avec des fluorochromes, mimant un défaut de compensation ou des phénotypes atypiques. Quatre types d'interférences ont été observés : type 1 : avec deux cyanine 7 (a); type 2 : avec cyanine 5 et Cyanine 7 (e); type 3 : avec cyanine 5 avec réactions croisées pour l'Alexa (c); type 4 : avec phycoérythrine (g). Les figures b, d, f et h représentent les marquages respectifs de la colonne de gauche, de cellules après lavage.

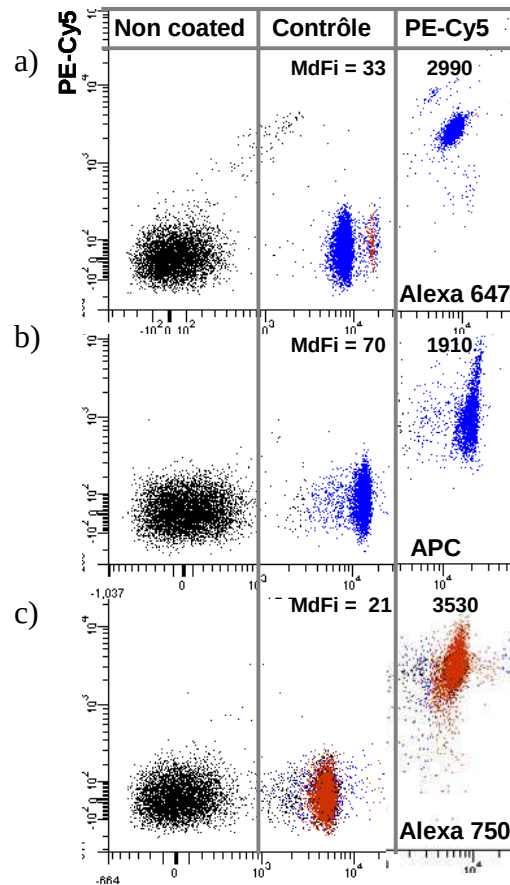


Nous avons mis au point un test rapide, multi-paramétrique et quantitatif sur des billes, par cytométrie en flux, pour mesurer ces activités.

Artéfacts par interaction directe entre fluorochromes

Nous avons également montré des interactions directes du fluorochrome PE-Cy5 avec Alexa 647 et, à moindre intensité, avec APC (2008.4). Cette interaction entre fluorochromes eux-mêmes peut aboutir à des images de doubles expressions inattendues (fig 9). Elle est systématique, non liée à l'échantillon et concerne un fluorochrome parmi les plus utilisés. Elle peut être reproduite avec le fluorochrome PE-Cy7 mais avec une moindre intensité. Seuls les Alexa 647 et 750 ont été testés.

Figure 9 : Artéfact de marquage par interaction directe entre PE-Cy5 et Alexa 647 (a), APC (b) et Alexa 750 (c). L'interaction dépend de la dose du fluorochrome et non de l'échantillon.



1.5 Variations de diversité des populations lymphocytaires

Nous avons décrit d'autres aspects de la diversité de la population lymphocytaire T (*manuscripts en préparation*):

- Variabilité d'expression de CD3 sur les lymphocytes T périphériques et signification fonctionnelle. La densité de surface est largement distribuée. Elle dépend du clonotype et s'accompagne de nette différence de réponse à un stimulus (2008.3).

1.6 Approche théorique de la dynamique des populations lymphocytaires

La constitution des populations lymphocytaires est en dynamique permanente. Elle résulte des expansions et contractions de clones individuels sous l'influence des conditions extérieures et des règles d'homéostasie.

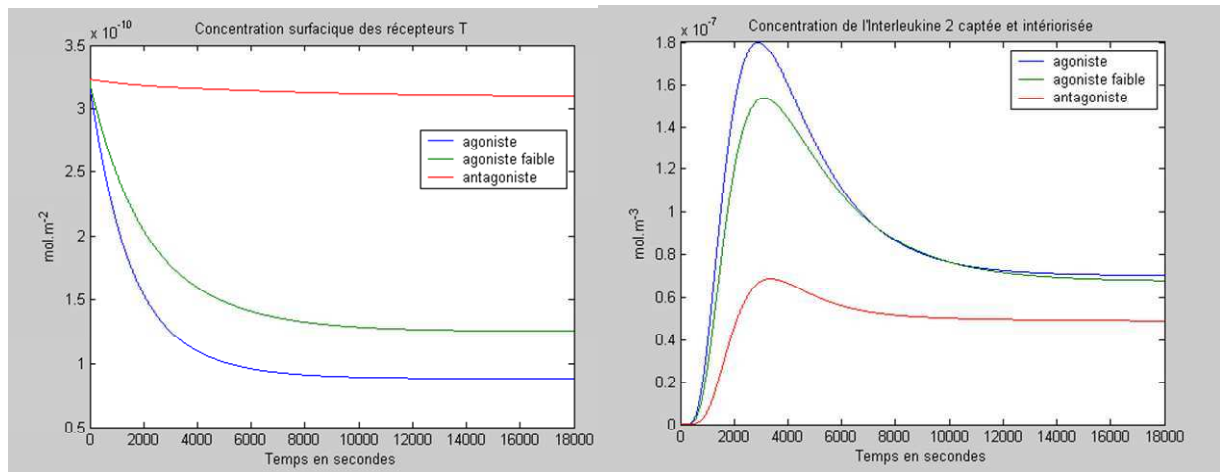
L'expansion clonale est nécessaire pour une bonne immunisation et une mémoire à long terme. Elle résulte de la prolifération des lymphocytes activés par le peptide spécifique présenté par la cellule présentatrice. L'amplitude de la réponse dépend essentiellement de l'affinité du récepteur T (TCR) pour le complexe MHC-peptide. Une faible affinité peut entraîner une tolérance alors qu'une trop forte affinité entraîne l'apoptose des lymphocytes concernés.

La réaction de reconnaissance peut être réduite à la combinaison d'interactions chimiques entre récepteurs et ligands, suivant les lois de la thermodynamique. Nous avons donc émis l'hypothèse que la cinétique de réaction lymphocytaire pouvait être représentée mathématiquement et que la résultante des dynamiques individuelles pouvait être modélisée (**Diplôme** ingénieur Clair-Sophie HAUDIN, **Thèse** Caroline BIDOT). Le travail a été réalisé avec l'aide de collaborateurs physiiciens de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne (Bernard GUY et Frédéric GRUY).

Nous avons d'abord conçu un modèle mathématique de la réponse lymphocytaire T au niveau individuel, en fonction de l'affinité et de la concentration du peptide en question (**2008.1**).

Le modèle est composé de 22 équations différentielles et de plus de 45 paramètres. En utilisant un logiciel mathématique, nous pouvons prévoir la cinétique d'apparition des molécules de membranes (TCR, CD3, CD69, CD25) ou solubles (IL-2) sous l'effet de l'activation. Les courbes sont proches de données expérimentales disponibles dans la littérature (fig. 10). Cependant, les données expérimentales manquent pour compléter l'ajustement du modèle mathématique et sa validation. Nous avons donc entrepris des études expérimentales, d'abord chez des souris en utilisant des antigènes viraux (CMV et grippe – **2008.3**, **thèse** Fatima-Zahra El HENTATI).

Figure 10 : Simulations mathématiques de la stimulation lymphocytaire T spécifique selon l'affinité du récepteur pour le peptide (agoniste, agoniste faible et antagoniste). Représentation des cinétiques de densité membranaire du récepteur T et de la production d'Interleukine 2.



1.7 Réaction lymphocytaire T

Nous avons cherché à analyser la réaction lymphocytaire T au sein même du site inflammatoire dans deux modèles physiopathologiques: le rejet d'allogreffe et l'immunité anti-tumorale.

Les réactions inflammatoires ont été analysées par immunodosages de type ELISA mais également à l'aide d'une nouvelle technique sur billes par chimiluminescence que nous avons validée en collaboration avec nos collègues du laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital Lyon sud (1999.1) Plus tard, nous avons validé une méthode d'immunodosage sur billes, par fluorescence et cytométrie en flux (2004.3). Nous avons également utilisé des méthodes ELISPOT et de détection de cytokines cytoplasmiques ou de marqueurs d'activation par cytométrie en flux (1995.1).

Rejet d'allogreffe rénale

Au cours du rejet d'allogreffe rénale terminal, ayant nécessité la résection du greffon, nous avons eu la surprise d'observer que les lymphocytes résiduels du greffon exprimaient une forte activité IL-10 plutôt que des production d'IFN γ ou de TNF α comme nous l'attendions (1995.1 ; 1995.2). Les données théoriques de l'époque nous ont poussés à interpréter cette réaction comme étant paradoxalement de type Th2 alors qu'actuellement elle pourrait être considérée

comme de type Th3 (réponse immunitaire tardive, régulatrice). Il faut cependant noter que l'activité était probablement influencée par le traitement intense qui a été tenté pour éviter le recours à l'ablation du greffon.

Immunité anti-tumorale

Nous nous sommes intéressés à l'activité anti-tumorale des lymphocytes intra-tumoraux. Nous avons constaté la présence d'une grande quantité de lymphocytes T infiltrant les tumeurs contrairement aux tissus sains péri-tumoraux. Dans le cadre de l'étude clinique **PHRC 1996**, nous avons étudié l'aspect immunologique des épanchements pleuraux tumoraux (**Thèse J.P.HERBEUVAL**). Ces épanchements inflammatoires sont riches en cellules tumorales, en macrophages activés et en lymphocytes T que nous avons considérés comme des lymphocytes réactionnels anti-tumoraux.

Les macrophages ont un phénotype de cellules très activées. Nous avons montré que les macrophages péri-tumoraux, isolés par adhérence sur boîte de culture, étaient de fortes sources de cytokines cytotoxiques (TNF α , TRAIL et FasL) détectables dans des surnageants en présence de faibles quantités de cellules tumorales (**2003.3**). Nous avons également montré que ces cytokines produites pouvaient induire l'apoptose de cellules tumorales (lignées coliques). Ces cytokines étaient synergiques et activaient les récepteurs de mort cellulaire (death domains). Les macrophages de liquides d'origine non tumorale ne produisaient pas ces cytokines en culture.

La population lymphocytaire s'est révélée être polyclonale suggérant que les mécanismes inflammatoires induisaient un recrutement excessif et inapproprié de lymphocytes non spécifiques. En effet, cette forte infiltration lymphocytaire est inefficace pour contenir la progression de la tumeur suggérant une activité inhibitrice. De même, nous avons montré que les macrophages en contact avec de grandes quantités de cellules tumorales ne produisaient plus de cytokines cytotoxiques. Nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes péri-tumoraux pouvaient être en partie inhibés par les acteurs inflammatoires locaux ou les cellules tumorales elles-mêmes. Nous avons montré que des lignées de cellules tumorales d'origine digestive pouvaient produire des cytokines inhibitrices (IL-10) active sur les macrophages dans le contexte inflammatoire, sous l'effet de la forte production d'IL-6 par les macrophages (**2004.2**).

1.8 Biosécurité au cours de l'utilisation de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est un outil extrêmement puissant d'analyse cellulaire. Les analyses se font généralement sur cellules fraîches et les applications sont fréquentes sur des échantillons à risques infectieux (patients séropositifs pour HIV, HCV ...). Le risque est encore plus évident lors des étapes de tris cellulaires, surtout avec les nouveaux instruments de tri à haute vitesse, émettant des particules très fines.

Nous avons été invité par le conseil d'administration de l'ISAC à participer au comité international de biosécurité en cytométrie en flux en 2000. Ce comité comprenait des experts de grands centres de cytométrie : Ingrid Schmid (Los Angeles, California); David Ambrozak et Stephen P. Perfetto (Vaccine Research Center, NIAID; NIH Bethesda, Maryland); Gerald E. Marti (Division of Cell and Gene Therapies, CBER FDA; NIH, Bethesda, Maryland); Delynn M. Moss (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia). Nous y étions le seul représentant européen.

Notre travail a consisté à faire une enquête internationale sur les consignes de sécurité pratiquées dans les différents centres, en fonction de l'activité. Nous avons consulté les constructeurs pour prendre en compte les spécificités des nouveaux instruments. Nous avons également consulté les recommandations de la commission d'hygiène et de sécurité de l'INSERM, de la communauté européenne et du centre CDC des Etats Unis. Le travail a permis d'organiser un **atelier** au cours du congrès international ISAC 2004 et de rédiger de nouvelles recommandations internationales qui ont été publiées après validation par des experts indépendants (2007.2). Ces nouvelles recommandations devraient servir de référence pour les institutions internationales. Des fiches de recommandation standardisées, en français sont en cours de préparation pour les proposer aux comités d'hygiène et sécurités en charge des centres francophones.

2 – Détection de cellules tumorales dans des liquides biologiques

Notre objectif était centré autour de la détection de cellules tumorales, à titre diagnostic ou pronostic (risque métastatique). La détection de cellules tumorales dans des liquides biologiques est encore morphologique, par microscopie sur frottis, après coloration. Cette méthode, manuelle est grande consommatrice de temps, très dépendante de l'opérateur et in fine, peu sensible et peu spécifique. Elle est très difficile à standardiser et nécessite des doubles ou triples lectures pour des études multicentriques.

La problématique est proche de celle du diagnostic des hémopathies. Une part est faite par analyse morphologique (sur frottis ou apposition de ganglions). Mais la cytométrie en flux a apporté des informations très précieuses pour la classification des maladies. En effet, les méthodes cytométriques pourraient apporter des informations bien plus précises que les techniques actuelles, par la caractérisation multiparamétrique de cellules tumorales, l'évaluation de leur degré de dé-différentiation, leur propension à migrer, la réponse au traitement et la détection de cellules tumorales circulantes.

Comparativement à l'étude des leucocytes, nous avons constaté que les moyens d'analyse multiparamétriques étaient très limités pour les cellules tumorales. Ce déficit est en partie lié à la pauvreté d'outils bien caractérisés (anticorps) pour la cytométrie.

Dans le but d'apporter une aide technologique, en partie automatisable et pouvant être standardisée, nous avons entrepris de développer l'immunodétection en cytométrie en flux. Nous nous sommes d'abord intéressé aux cellules en suspension dans des liquides biologiques qui nous paraissaient particulièrement adaptés à nos objectifs. Dans le cadre d'un **PHRC** (appel d'offre National 1996); en collaboration avec le laboratoire de cytologie-histologie, Professeur M COTTIER (**Thèse** : Karine PASSEBOSC-FAURE), nous avons développé des outils de détections et de caractérisation de cellules d'adénocarcinomes (principalement les cancers d'origines gynécologiques et digestives) dans des épanchements pleuraux. Nous avons cherché à les différencier des cellules de mésothéliome (autre origine tumorale fréquente et qui pose un problème grave de santé publique) et à des cellules inflammatoires de liquides non tumoraux et non infectieux. Nous nous sommes ensuite intéressés à des tumeurs solides en collectant les cellules par dissociation pour le cancer du colon (mémoire **DEA** : Pierre BLANC-) et du rein de l'adulte (**thèse** et post-doctorat : Guorong LI-).

Devant le manque d'outils adaptés à cette problématique, nous avons développé de nouveaux outils biologiques pour la recherche de nouveaux marqueurs (protéomique, génomique fonctionnelle) ou biotechnologiques pour l'aide au travail de protéomique (traitement de données d'électrophorèse bi-dimensionnelle) ou pour pallier les limites de la cytométrie en flux (développement d'un nouveau concept instrumental).

2.1 Protéomique

Les tumeurs se distinguent du tissu sain, par des propriétés morphologiques et fonctionnelles (capacité de renouvellement, invasion, migration..) qui reflètent une production anormale de molécules qui peuvent servir d'identifiants notamment par immunomarquage. Cependant, encore très peu de ces marqueurs suffisamment discriminant sont identifiés. Récemment, de nouvelles techniques permettent d'analyser finement la composition de l'ensemble du protéome (électrophorèse bi-dimensionnelle ; spectrométrie de masse..) comme nous l'avons décrit dans une courte revue (**2003.2**). Plusieurs projets à grande échelle analyse l'expression différentielle du protéome de tumeurs par rapport à des tissus sains. La complexité de ces méthodes fait que les résultats dépendent considérablement de la méthodologie de chaque étape.

Dans le cadre d'une collaboration avec un partenaire industriel régional (Dr Geneviève CHOQUET-KASTYLEVSKY ; Société **BioMérieux S.A. MARCY L'ETOILE**)), nous avons participé à la mise en place et au déroulement d'un projet d'analyse protéomique du cancer du colon. Nous nous sommes impliqués à plusieurs étapes du processus :

- mise au point des méthodes d'isolement des cellules à partir de tumeurs solides (Mémoire de **DEA** : Pierre Blanc) puis préparation d'échantillons (tumeurs et tissus sains) issus de pièces chirurgicales fraîches, avec la collaboration étroite des chirurgiens (service du Professeur J PORCHERON) et des service d'anatomopathologie (Professeur PEOC'H). Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un protocole de recherche clinique (**NODDICAP**) avec validation éthique et juridique.
- Le principe de l'étude repose sur la comparaison de gels d'électrophorèse bidimensionnelle, comparaison par paire (entre tissu sain et tumeur du même donneur) puis par type tumoral. Nous avons participé à l'optimisation des méthodes biochimique pour réduire au mieux la variabilité des images des gels bidimensionnels mais il restait très difficile de pouvoir aligner complètement les traces protéiques et identifier les

différences d'expression. Nous avons donc initié et encadré une collaboration entre le laboratoire de protéomique du centre de recherche BioMérieux (laboratoire de protéomique et centre de biomathématiques) et les compétences de l'Ecole des Mines en analyse d'image et traitement des données (Professeurs JC PINOLI, F GRUY, Centre Ingénierie et Santé). Ce travail a fait l'objet d'un stage de **master II** puis d'une thèse de sciences (bourse **CIFRE**) qui devrait être soutenue dans le premier semestre 2008 (**thèse** : Fabien BERNARD).

- Les résultats actuels ont déjà permis au laboratoire de la société BioMérieux d'identifier des marqueurs candidats et de produire de nouveaux anticorps monoclonaux spécifiques. Nous participons à la caractérisation de ces anticorps (sensibilité, spécificité ; localisation cellulaire des antigènes qui ont été sélectionnés) en testant les produits par Cytométrie en flux ; ELISPOT, microscopie confocale, sur des lignées cellulaires d'intérêt et sur des échantillons cliniques (Mémoire de **master II** : F MOHAMMED; Mémoire de fin d'étude **d'ingénieur EPHE** : ML STACHOWICZ).
- Nous mettons notre savoir- faire à disposition du club de protéomique du Cancéropole Lyon - Rhône-Alpes-Auvergne (CLARA).

2.2 Génomique :

Compte tenu de la pauvreté des outils disponibles en immunomarquage et de la limite attendue de sensibilité des techniques de cytométrie, nous avons cherché à comparer les performances de la cytométrie en flux avec celles de la biologie moléculaire. Cette dernière est réputée de très grande sensibilité et de grand potentiel de développement (pratiquement tous les gènes sont accessibles) mais encore peu de gènes candidats ont été étudiés pour la détection tumorale.

Nous avons mis au point des méthodes de génomique fonctionnelle par RT-PCR classique puis en temps réel pour détecter des cellules d'adénocarcinomes d'origines gynécologiques, digestives (**Thèses** : Karine PASSEBOSC-FAURE ; Cristina IOBAGIU) et de tumeurs du rein de l'adulte (**Thèse** : Guorong LI).

Certains marqueurs sont d'un grand intérêt selon l'origine anatomique de la tumeur comme le MN/CA9, C-KIT, Cadherine 6, S100A1 pour le cancer du rein (**2005.2 ; 2005.4 ; 2005.10**) ou la

Mammaglobine pour le cancer du sein (2005.8) mais ils sont rarement complètement spécifiques (2007.3, 2005.8) et soulignent le besoin de nouveaux marqueurs et la probable nécessité de les combiner, ce qui constitue le grand avantage de la cytométrie.

Nous avons également cherché des marqueurs pronostiques par l'étude de diversité de microsatellites de récepteurs hormonaux dont le rôle pathogénique est bien établi pour le cancer du sein (2005.9 ; Thèse IOBAGIU C). Nous avons analysé les instabilités associées avec le cancer par anomalies nucléotidique sur des régions microsatellites (Thèse IOBAGIU C) ou plus grossières de ploïdie dans le cancer du rein (2005.1, 2002.1).

2.3 Immunodétection, Immuno-analyse d'adénocarcinomes

Les méthodes de génomique ne permettent qu'une analyse globale d'une population cellulaire ou d'un fragment de tissu ou tumeur. Il est possible mais très difficile de séparer des cellules avant l'extraction du matériel génomique, surtout pour l'ARN messenger, en faible quantité et très fragile. Inversement, la cytométrie permet la caractérisation précise, multiparamétrique de chaque évènement et ainsi d'approcher la diversité de l'échantillon cellulaire analysé. Or, les phénotypes des cellules tumorales peuvent être proches de ceux des cellules très inflammatoires et l'émergence de clones à fort potentiel invasif ou métastatique ou ayant acquis une résistance à un traitement proviennent probablement des phénotypes très minoritaires au sein d'une tumeur.

Pour pouvoir utiliser la cytométrie sur les cellules d'adénocarcinome, nous avons effectué en premier des immuno-marquages simples pour pouvoir tester beaucoup d'anticorps primaires, disponibles pour l'immuno-histologie. Les résultats préliminaires nous ont permis de sélectionner quelques anticorps d'intérêt. Par contre, nous avons observé qu'aucun n'était vraiment spécifique du caractère de malignité ou de l'origine anatomique de la cellule. Ces conditions sont primordiales en absence de toute donnée morphologique des analyses cytométriques, contrairement à l'immuno-histologie ou immuno-cytologie au microscope. Cependant, comme pour les hémopathies, nos résultats confirment que des combinaisons appropriées de marqueurs devraient apporter des informations très intéressantes pour le typage des cellules tumorales. De plus, il est possible d'éliminer des cellules inflammatoires avec des marqueurs de lignées hématopoïétiques.

Nous avons pu montrer la caractérisation de lignées ou de cellules fraîches de tumeurs rénales en suspension (2000.5, 2001.1, 2003.2) ou d'origine digestive (thèse Karine PASSEBOSC-

FAURE). De plus, nous avons pu mettre en évidence une baisse d'expression de molécules de cohésion tissulaire sur des tumeurs de colon, comparées aux tissus sains en bordure de pièce chirurgicale du même donneur. Nous avons également pu montrer que certaines cellules tumorales exprimaient des molécules d'adhérence qui jouent un rôle dans la nidation des métastases (Mémoire de **DEA P BLANC**). Nous n'avons malheureusement pas obtenu suffisamment d'échantillons pour pouvoir publier ces résultats.

2.4 Biotechnologie

La cytométrie en flux peut analyser des cellules en suspension à une grande vitesse (jusqu'à 10 000 cellules par secondes). Cependant, seulement de petits échantillons (ex 100µl) peuvent être analysés ce qui limite la sensibilité de la méthode. De plus, la cytométrie en flux ne donne que des informations de signal lumineux qu'il est difficile d'attribuer à une cellule. Ainsi, dans le problème des événements rares, il est très difficile de distinguer quelques signaux positifs parmi les 100 000 signaux négatifs, sans craindre d'avoir détecté un artefact électronique.

Compte tenu des limites technologiques de la cytométrie en flux, nous avons conçu un nouveau système, original, **d'immunocapture et détection** en immunofluorescence par excitation avec une onde évanescence et **imagerie** par caméra CCD et analyse d'image (**Projet INCA ; Pr Frederic GRUY**, Ecole des Mines 2007). Des études préliminaires ont été menées avec simulations informatiques sur FemLab (stage de **diplôme ingénieur** Philippe SCHWERDT). Un prototype (fig.11) a été construit (**Stage ingénieur** Mathieu FERNANDES ; EMSE de Mars à Septembre 2007), en collaboration avec Pr. Olivier Parriaux (du laboratoire Hubert Curien, Université de Saint-Etienne).

fig 11 : Microbiocapteur pour la détection de cellules : vue montage optique

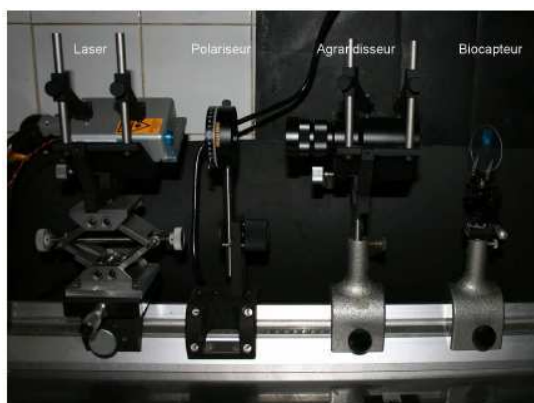


Fig. 1.3 Dispositif de couplage du biocapteur

La partie fluidique a été conçue et la chambre d'écoulement a été réalisée à l'Ecole des Mines. La partie optique est mise au point : la résonance sur les plaques à disposition a été trouvée. Les résultats obtenus sont très convaincants et prometteurs. Des essais devront maintenant être faits avec un écoulement de fluide sur la face avec réseau résonnant et l'illumination sur la base du substrat. Les substrats en quartz ont été fabriqués et des traitements pour la fonctionnalisation de leur surface optique ont été testés pour l'apposition de la couche biologique.

Ce projet « **Microbiocapteur pour la détection multiparamétrique quantitative de cellules tumorales** » fait l'objet de coopération multi-disciplinaire entre trois institutions stéphanoises : CHU ; Ecole Nationale Supérieure des Mines (UMR CNRS 5148) et Université Jean Monnet (UMR 5516 CNRS). Il est financé par un appel d'offre « **pré-preuve de concept** » INCA 2006 N°: 54. Il a été retenu dans l'Axe n°1 « Nanotechnologies, Imagerie & Cancer » des projets prioritaires du plan 2008-20012 du Cancéropole **CLARA** .

3 – Diagnostic de l'allergie immédiate

Nous nous sommes également intéressés à l'analyse cytométrique d'une autre population minoritaire dans le sang périphérique (les basophiles), rarement étudiée, mais qui peut jouer un rôle parfois dramatique dans les réactions anaphylactiques.

Le diagnostic d'allergie immédiate peut être difficile. Il est généralement affirmé par l'histoire clinique. La causalité exacte de l'allergène peut être confirmée par tests épicutanés ou intra-dermiques et éventuellement par des tests de provocation, à proximité d'une unité de réanimation. La recherche d'immunoglobulines sériques spécifiques de l'allergène confirme la sensibilisation mais pas le risque anaphylactique. Les tests cutanés peuvent ne pas être possibles, soit en cas pathologie cutanée soit surtout à cause des risques iatrogènes quand la réaction a été très forte. Il arrive que des patients fassent des réactions même aux tests cutanés malgré la quantité infinitésimale qui est utilisée.

Les allergies aux venins d'hyménoptères et aux médicaments ont les plus gros risques d'accidents graves, notamment au cours de gestes médicaux pour les médicaments. Il doivent être pris en charge dans un hôpital et il nous paraît indispensable que ce service soit assuré au sein du CHU de Saint-Etienne qui n'a pas d'allergologue titulaire à temps plein. Pour permettre cette activité, nous avons organisé, avec des allergologues vacataires, une consultation d'allergie aux médicaments qui constitue maintenant une unité fonctionnelle au sein du service de dermatologie. Nous avons organisé des formations pour les praticiens du bassin d'activité du CHU sur les accidents en cours d'anesthésie (**EPU Mars 2004**) et des injections de produits de contraste (**EPU Mars 2005**). Nous convenu d'une procédure de **conduite à tenir** en cas d'accident et avons proposé une **trousse diagnostic** prête à être utilisée au moment de l'accident. Ces éléments ont été distribués dans tout le bassin et sont placés dans les blocs opératoires ou les salles d'imagerie. Nous avons été enrôlé dans des études nationales de suivi (groupe **GERAP** des anesthésistes) et de caractérisation (**PHRC 2006 CIRTACI** « Exploration des réactions d'anaphylaxie aux produits de contraste en imagerie », Pr O CLEMENT, Hôp Européen George Pompidou).

Il est nous est paru très important de pouvoir apporter un support biologique au diagnostic des allergies à hauts risques. Nous testons le risque anaphylactique in vitro, en mettant en contact les basophiles périphériques du patient (qui reflètent les mastocytes tissulaires) et les allergènes

incriminés. Les basophiles expriment à leur surface des récepteurs pour la chaîne epsilon. Ces récepteurs captent les IgE sériques. Dans le test que nous avons utilisé, les basophiles sont identifiés par l'immunomarquage des IgE de surface. L'activation induit une dégranulation en moins de 20 minutes. La fusion des granules avec la membrane cytoplasmique fait exprimer le CD63 sur la membrane externe. La mesure est quantitative, précise et rapide. Nous avons démontré sa validité pour les allergies aux venins d'hyménoptères, en la comparant au test de référence qui mesure la libération d'histamine dans le surnageant (**2003.4**). Le test par cytométrie est plus rapide et plus précis et devrait remplacer le test de libération d'histamine qui nécessite l'utilisation de radio-immuno-dosages.

Nous avons fait la promotion de ce test sous forme de communications. Nous avons organisé un **atelier** au Congrès de cytométrie Grenoble 2005 et une **Journée Thématique** à Paris Novembre 2006. Cette méthode et des alternatives développées depuis, ont fait l'objet de plus de 50 études au cours des dernières années. Toutes, sauf une, étaient faites par des équipes européennes. Les résultats sont difficiles à comparer car les critères et seuils de décisions sont souvent différents. Des systèmes commerciaux sont maintenant proposés avec des conditions de préparations qui diffèrent et sont parfois même contradictoires. Nous pensons que ce défaut de standardisation gêne à l'adoption de cette méthode pour le diagnostic de routine. Nous avons donc proposé un travail de consensus et constitué un **groupe européen** qui comprend la participation de toutes les équipes expérimentées. Nous avons co-organisé une première **réunion de travail** à Pamplone en Octobre 2007. Des groupes thématiques ont été constitués. Une rencontre intermédiaire est programmée à **Barcelone** en juin 2008 au cours du congrès de l'Académie Européenne d'Allergie et Immunologie Clinique (**EAACI**). Nous organiserons la seconde réunion à **Saint-Etienne** en octobre 2008.

4 – Suivi de marqueurs systémiques de réactions aigües

Nous avons développé et validé des techniques de dosage de médiateurs de la réponse inflammatoire systémique : cytokines, protéines de la phase aiguë (notamment procalcitonine).

Dès les phases plus immédiates de l'activation du système immunitaire, des médiateurs sont sécrétés, parfois massivement, notamment par les macrophages et polynucléaires. Nous nous sommes intéressés aux cytokines qui jouent un rôle primordial dans la régulation de la réponse immunitaire. Nous avons d'abord étudié la production de monokines comme le TNF α et l'IL-1,

dans les vascularites au cours de notre passage à Genève dans le laboratoire de l'OMS (Pr PH LAMBERT **(1989.3)**). Au cours de notre séjour à l'University College of London, nous nous étions intéressé au mode d'action paracrine et pexicrine du TNF α dans son activité cytotoxique (notamment anti-tumorale et l'immunité des infections par les mycobactéries). Nous avons notamment cherché sa capacité d'interaction avec les protéines fortement glycosylées qui pourraient servir de réservoir **(1993.2)**. Nous avons également observé la présence d'inhibiteurs naturels dans le sérum **(1990.2)**. Ces inhibiteurs ont été identifiés comme étant une fraction soluble des récepteurs libres du TNF α qui sont relargués après action du TNF α sur la cellule. Ces molécules ont un faible poids moléculaire qui leur permet d'être filtrées et éliminées par le glomérule rénal.

Au CHU de Saint-Etienne, nous avons montré que ces molécules inhibitrices étaient fortement accumulées dans le sérum d'insuffisants rénaux **(1994.1)** et pouvaient ainsi participer au déficit immunitaire de ces patients. Nous avons étudié la production des cytokines au cours du rejet aigu **(1994.1)**, des infections graves et du choc septique **(1991.1, 2000.1, 2000.2)** par dosage des molécules et par biologie moléculaire **(DEA F RANCON)**. Nous pensons que les dosages des médiateurs précoces des réactions inflammatoires graves devraient permettre de mieux connaître la nature de la réaction et probablement d'identifier différentes formes.

Cependant, ces dosages disponibles en technique ELISA sont difficiles à pratiquer en urgence et le délai de réponse les rend inutiles pour la prise en charge des patients. Nous avons donc participé à la validation d'une technique de dosage par chimiluminescence, rapide et automatisée, sur automate Immulite (société DPC : **1999.1**) puis par méthode multiplexe en cytométrie en flux **(2004.4)**. Les cytokines sont souvent redondantes. Certaines sont pro-inflammatoires. D'autres participent à la régulation et la résolution de l'inflammation avec dans certains cas un effet paradoxal de déficit immunitaire qui a été appelé « immunoparalysie ». Nous pensons qu'il est important de prendre en compte plusieurs cytokines, pro et anti-inflammatoires, par dosages multiplexes pour l'interprétation et le suivi du processus pathologique **(2004.4)**. Nous pensons que les méthodes multiplexes sont particulièrement adaptées. Cependant, il n'existe pas pour l'instant de système compatible avec l'activité de routine en urgence. Nous avons également cherché à surveiller cette immunoparalysie chez des patients en réanimation en mesurant la baisse d'expression des molécules HLA de classe II sur les monocytes circulants.

Enfin, nous avons analysé des reflets indirectes du processus inflammatoire, souvent résultat de l'induction de phase aigue par les cytokines. L'activation des cellules métaboliques (surtout hépatiques) par les cytokines endocrines (IL-1 α , IL-6..), entraîne une production rapide et massive de protéines impliquées dans les divers mécanismes non spécifiques de protection de l'organisme. Cette réaction peut être observée par les modifications quantitatives et même qualitatives des protéines sériques. Nous avons montré que ces protéines avaient des changements de glycosylation (**1991.1**). Les changements quantitatifs les plus connus concernent la protéine réactive C (CRP) qui est utilisée en diagnostic de routine. Cette protéine est rapidement et fortement produite et permet de mesurer objectivement l'intensité de la réaction inflammatoire. Nous nous sommes intéressés à une autre protéine, la **PROCALCITONINE** (PCT), qui était alors récemment décrite par un équipe parisienne et qui avait la propriété d'être produite sélectivement au cours des infections bactériennes.

Nous avons confirmé cette spécificité et montré que ce marqueur d'inflammation était d'une grande utilité pour le diagnostic des méningites (**1999.2, 2000.1**) ou des ascites (**2000.2**, une thèse de médecine) d'origines bactériennes, permettant de discerner rapidement les céphalées ou ascites fébriles graves des infections virales bénignes. Nous avons également confirmé que la PCT était bien induite par des produits bactériens et que la maîtrise thérapeutique de l'infection s'accompagnait d'une réduction rapide des taux sériques de la PCT (**2000.3**).

La PCT est donc un marqueur unique d'efficacité de l'antibiothérapie et permet un éventuel ajustement thérapeutique très précoce. Nous avons confirmé que cette production était corrélée à la production de cytokines (**2004.3**) et nous avons vérifié qu'elle n'était pas significativement influencée par la fonction rénale ou l'hémodialyse sauf dans le cas d'hémofiltration avec des membranes à haute perméabilité. Nous avons mis en place en 2007, un dosage en urgence (24h/24h) de cette protéine au sein du pôle de Biologie-Pathologie du CHU de Saint-Etienne, pour les centres de soins de la Loire. Cette procédure fait l'objet d'une évaluation des pratiques professionnelles (**EPP 2007**) dans le cadre de la certification du CHU.

5 – Autres études

Dans le cadre de notre activité nous avons participé à divers travaux sous forme de conseils scientifiques, aide technique ou prestation de service dans le cadre des projets du GIMAP ou de projets de Recherche clinique.

Nous avons participé à l'étude qui démontrait un rôle protecteur des IgA sécrétoires contre les infections respiratoires opportunistes par *Pneumocystis carinii* chez le patient infecté par HIV **(2000.3)**.

Nous avons participé à la mise au point et la validation par cytométrie en flux d'une méthode de préparation de cellules de Langerhans à partir de pièces chirurgicales de peau **(2003.1)**.

Nous avons notamment participé à des études des mécanismes d'infestation du virus HIV par voie muqueuse. Il a été possible de démontrer une possibilité de pénétration sélective selon le co-récepteur requis par le virus **(2005.7)**. Cette infection est accompagné d'une participation de la chimiokine CCL20 en modulant les mouvements de cellules dendritiques qui servent de réservoirs et de vecteurs pour la virus dans l'organisme **(2005.6)**.

4 - Travaux et Publications

Articles dans journaux à comité de lecture

- 1987.1 **[Accidents rénaux des anti-inflammatoires non stéroïdiens.]**
F Ducret, P Pointet, H Bonnefoi, JP Rabatel, **C Lambert**.
Lyon Mediter Med 1987; 23: 1170-1172.
- 1987.2 **[Monoclonal dysglobulinemia and kidney (a retrospective study of 771 cases).]**
C Lambert, P Vialtel, P Gros Lambert, D Cordonnier.
Néphrologie 1987; 8: 63-67.
- 1988.1 **[Deficit héréditaires en C5 et méningite récidivante à Neisseria meningitidis.]**
F Ducret, M Decoux, P Pointet, **C Lambert**, E Groperrin, A Sedaillan
La Rev Med Int. 1988; 9:534-537.
- 1989.1 **[Intéraction Ciclosporine-Ticarcilline chez un transplanté rénal.]**
C Lambert, P Pointet, F Ducret.
La Press Med. 1989; 18: 230-231.
- 1989.2 **[Insuffisance rénale sévère révélatrice d'une sarcoïdose.]**
F Ducret, P Pointet, **C Lambert**, JP Chevalier
La Press Med. 1989; 18:1979-1980.
- 1989.3 **Serum Cytokine changes in systemic vasculitis.**
GE Grau, P Roux-Lombard, C Gysler, **C Lambert**, PH Lambert, JM Dayer, L
Guillevin.
Immunology. 1989; 68:196-198.
- 1990.1 **[Can Obesity lead to advanced renal failure?]**
C Lambert, P Pointet, F Ducret
Néphrologie. 1990; 11:104.
- 1990.2 **An inhibitor of the toxicity of tumour necrosis factor in the serum of patients with sarcoidosis, tuberculosis and Crohn's disease.**
N Foley; **C Lambert**, M McNicol, N Johnson, Rook-GA
Clin-Exp-Immunol. 1990 ; 80(3): 395-399.
- 1991.1 **The role of oil and agalactosyl IgG in the induction of arthritis in rodent models.**
G Rook, S Thompson, M Buckley, C Elson, R Brealey, **C Lambert**, T White, T
Rademacher.
Eur-J-Immunol. 1991; 21(4): 1027-1032.
- 1991.2 **[Renin secreting tumor and severe hypertension. A propos of a new case.]**
F Ducret, P Pointet, **C Lambert**, J Pin, M Baret, JM Botta, M Mutin, S Colon, M
Vincent.
Néphrologie. 1991; 12(1): 17-24.

- 1992.1 **The development of monoclonal antibodies to the human mitochondrial 60-kd heat-shock protein, and their use in studying the expression of the protein in rheumatoid arthritis.**
M Sharif, JG Worrall, B Singh, RS Gupta, PM Lydyard, **C Lambert**, J McCulloch, G Rook.
Arthritis-Rheum. 1992; 35(12): 1427-1433.
- 1993.1 **Primary IgA glomerulonephritis and MHC revisited.**
FC Berthoux, E Alamartine, B Laurent, P Berthoux, C Vacherot, **C Lambert**, JC Le-Petit.
Contrib-Nephrol. 1993; 104: 54-60.
- 1993.2 **The interaction of Tamm-Horsfall protein with the extracellular matrix.**
C Lambert, R Brealey, J Steele, GA Rook.
Immunology. 1993; 79(2): 203-210.
- 1994.1 **Natural soluble TNF antagonists in End Stage Renal Failure and following renal transplantation.**
C Lambert, P Berthoux, M Vindimian, J Hacini, F Berthoux.
Nephrol, Dial Transpl. 1994; 9: 1791-1796.
- 1995.1 **Differential IFN-gamma and IL-10 production by subsets of T Lymphocytes corresponding to a differential outcome of human Kidney Graft.**
C Lambert, P Merville, C Pouteil-Noble, I Durand, JL Touraine, F Berthoux, J Banchereau.
Transpl Proceed. 1995; 27(2) : 1669-1670.
- 1995.2 **High frequency of Il-10 secreting CD4+ graft infiltrating lymphocytes in promptly rejected kidney allograft.**
P Merville, **C Lambert**, I Durand, C Pouteil-Noble, JL Touraine, F Berthoux, J Banchereau.
Transplantation. 1995; 59(8): 1113-9.
- 1995.3 **Is there IgA from gut mucosal origin in the serum of children with Henoch-Schonlein purpura?**
Moja P, Quesnel A, Resseguier V, **Lambert C**, Freycon F, Berthoux F, Genin C.
Clin Immunol Immunopathol. 1998; 86(3): 290-7.
- 1999.1 **Evaluation of an automated immunoassay method for cytokine measurement using the Immulite Immunoassay system.**
Berthier F, **Lambert C**, Genin C, Bienvenu J.
Clin Chem Lab Med. 1999; 37(5): 593-599.
- 1999.2 **High sensitivity and specificity of serum procalcitonin levels in adults with bacterial meningitis.**
Viallon A, Zeni F, **Lambert C**, Pozzetto B, Tardy B, Venet C, Bertrand JC.
Clin Infect Dis. 1999; 28(6): 1313-1316.
- 2000.1 **[Rapid diagnosis of the type of meningitis (bacterial or viral) by the assay of serum procalcitonin].**
Viallon A, Pouzet V, Zeni F, Tardy B, Guyomarc'h S, **Lambert C**, Page Y, Bertrand JC.
Presse Med. 2000; 29(11):584-588.

- 2000.2 **Serum and ascitic procalcitonin levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis: diagnostic value and relationship to inflammatory cytokines.**
Viallon A, Zeni F, Pouzet V, **Lambert C**, Quenet S, Aubert G, Guyomarch S, Tardy B, Bertrand JC.
Intensive Care Med. 2000; 26(8): 1082-1088.
- 2000.3 **Decreased production of local immunoglobulin A to *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid from human immunodeficiency virus-positive patients.**
Jalil A, Moja P, **Lambert C**, Perol M, Cotte L, Livrozet JM, Boibieux A, Vergnon JM, Lucht F, Tran R, Contini C, Genin C.
Infect Immun. 2000; 68(3): 1054-1060.
- 2000.4 **Expression of Pgp9.5 on Langerhans' cells and their precursors.**
Hamzeh H, Gaudillere A, Sabido O, Tchou I, **Lambert C**, Schmitt D, Genin C, Misery L.
Acta Derm venereol. 2000; 80: 14-16.
- 2000.5 **Flow cytometric analysis of antigen expression in malignant and normal renal cells.**
Li G, Passebosc-Faure K, **Lambert C**, Gentil-Perret A, Blanc F, Oosterwijk E, Mosnier JF, Genin C, Tostain J.
Anticancer Res. 2000; 20(4): 2773-2778.
- 2001.1 **The expression of G250/MN/CA9 antigen by flowcytometry : its possible implication for detection of micrometastatic renal cancer cells.**
Li G, Passebosc-Faure K, **Lambert C**, Gentil-Perret A, Blanc F, Oosterwijk E, Mosnier JF, Genin C, Tostain J.
Clin Cancer Res. 2001; 7(1): 89-92.
- 2002.1 **The in vivo DNA aneuploidization during expansion of conventional renal cell carcinoma.**
Li G, Cottier M, Sabido O, Gentil-Perret A, **Lambert C**, Passebosc-Faure K, Genin C, Tostain J.
In Vivo. 2002; 16(5): 341-344.
- 2003.1 **Technique for obtaining highly enriched, quiescent immature Langerhans cells suitable for ex vivo assays.**
Tchou I, Sabido O, **Lambert C**, Misery L, Garraud O, Genin C.
Immunol Lett. 2003; 86(1): 7-14.
- 2003.2 **[Molecular and cytometric analysis of renal carcinoma cells. Concepts, techniques and prospective.]**
Li G, **Lambert C**, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J.
Prog Urol. 2003; 13(1): 1-13. French, review
- 2003.3 **Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis.**
Herbeuval JP, **Lambert C**, Sabido O, Cottier M, Fournel P, Dy M, Genin C.
J Natl Cancer Inst. 2003; 95(8): 611-21

- 2003.4 **Flow-cytometry versus Histamine release tests analysis of In vitro Basophil Degranulation in Allergy to Hymenoptera venom.**
C. Lambert, L. Guilloux, C. Dzviga, C. Gourgaud-Massias, C. Genin.
Cytometry. 2003; 52B(1): 13-9.
- 2003.5 **Rapid and sensitive detection of messenger RNA expression for molecular differential diagnosis of renal cell carcinoma.**
Li G, Cuilleron M, Gentil-Perret A, Cottier M, Passebosc-Faure K, Lambert C, Genin C, Tostain J.
Clin Cancer Res. 2003 ; 9(17): 6441-6.
- 2004.1 **CD3 bright T cell subset reveal $\gamma\delta$ T Cells.**
Lambert C, Genin C.
Cytometry, 2004; 61B; 45-53.
- 2004.2 **Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6.**
Herbeuval JP, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C.
J Immunol. 2004; 172(7): 4630-6.
- 2004.3 **Cytometric Bead Assay of cytokines in sepsis : clinical evaluation**
Vedrine C, Caraion C, Lambert C, Genin C.
Cytometry. 2004; 60B(1):14-22.
- 2004.4 **Epidemiologie des réactions anaphylactiques et anaphylactoides peranesthésiques en France. Septième enquête multicentrique 2001-2002.**
Mertes PM, Laxenaire MC et les membres du GERAP.
Annales Françaises d'Anesthésie Réanimation 2004; 23 : 1133-1143.
- 2005.1 **Different DNA ploidy patterns for the differentiation of common subtypes of renal tumors.**
Li G, Cottier M, Sabido O, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J.
Cell Oncol. 2005; 27(1): 51-6.
- 2005.2 **S100A1 and KIT gene expressions in common subtypes of renal tumours.**
Li G, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J.
Eur J Surg Oncol. 2005; 31(3): 299-303.
- 2005.3 **Persistent Oligoclonal CD4dimCD8+T cells in peripheral blood**
Lambert C, Iobagiu C, Genin C
Cytometry B Clin Cytom. 2005; 66B 10-17.
- 2005.4 **Cadherin-6 gene expression in conventional renal cell carcinoma: a useful marker to detect circulating tumor cells.**
Li G, Passebosc-Faure K, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J.
Anticancer Res. 2005; 25(1A) :377-81.
- 2005.5 **Significance of Unconventional CD4+CD8dim T cell subsets.**
Lambert C, Ibrahnm M, Iobagiu C, Genin C.
J Clin Immunol 2005; 25(5): 418-27.

- 2005.6 **Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction.**
Cremel M, Berlier W, Hamzeh H, Cognasse F, Lawrence P, Genin C, Bernengo JC, **Lambert C**, Dieu-Nosjean MC, Delezay O.
J Leukoc Biol. 2005; 78(1): 158-66.
- 2005.7 **Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV.**
Berlier W, Bourlet T, Lawrence P, Hamzeh H, **Lambert C**, Genin C, Verrier B, Dieu-Nosjean MC, Pozzetto B, Delezay O.
J Med Virol. 2005; 77(4): 465-74.
- 2005.8 **Evaluation of a panel of molecular markers for the diagnosis of malignant serous effusions**
Passebosc-Faure K, Li G, **Lambert C**, Cottier M, Gentil-Perret A, Fournel P, Perol M, Genin C.
Clin Cancer Res. 2005; 11(19 Pt 1) : 6862-7.
- 2005.9 **Microsatellite profile in hormonal receptor genes associated with breast cancer.**
Iobagiu C, **Lambert C**, Normand M, Genin C.
Breast Cancer Res Treat. 2005; 95(2): 153-159.
- 2005.10 **The Use of MN/CA9 Gene Expression in Identifying Malignant Solid Renal Tumors.**
Li G, Cuilleron M, Cottier M, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J.
Eur Urol. 2005; 49(2): 401-5.
- 2005.11 **Decrease in serum procalcitonin levels over time during treatment of acute bacterial meningitis.**
Viallon A, Guyomarc'h P, Guyomarc'h S, Tardy B, Robert F, Marjollet O, Caricajo A, **Lambert C**, Zeni F, Bertrand JC.
Crit Care. 2005; 9(4): R344-50.
- 2006.1 **Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs 4 color staining : a clinical evaluation of a new Flowcytometer.**
Lambert C, Iobagiu C, Genin C
Cytometry B Clin Cytom. 2006; 70(1): 29-38.
- 2007.1 **Thematic workshop on fluorescence compensation settings in multicolor flow**
Bayer J, Grunwald D, **Lambert C**, Mayol JF, Maynadie M.
Cytometry B Clin Cytom. 2007; 72(1): 8-13.
- 2007.2 **International Society for Analytical Cytology Biosafety Standard for Sorting of Unfixed Cells.**
Schmid I, **Lambert C**, Ambrozak D, Marti GE, Moss DM, Perfetto SP.
Cytometry A. 2007; 71(6): 414-37.
- 2007.3 **MN/CA9: a potential gene marker for detection of malignant cells in effusions.**
Li G, Passebosc-Faure K, Feng G, **Lambert C**, Cottier M, Gentil-Perret A, Fournel P, Pérol M, Genin C.
Biomarkers. 2007; 12(2): 214-20.

- 2008.1 **Mathematical modeling of T-cell activation kinetic**
Bidot C, Gruy F, Haudin C-S, El Hentati F, Guy B, and **Lambert C.**
Journal of Computational Biology – accepté (JCB-2007-0125).
- 2008.2 **Aberrant multicolor labeling mimicking atypical phenotyping in clinical analysis**
Iobagiu C, Leclerc C, Vedrine C, **Lambert C.**
Cytometry A (en cours de révision)
- 2008.3 **Diversity of CD3 membrane expression on peripheral T cells.**
El Hentati F, Gruy F, Iobagiu C, Thibault G, **Lambert C.**
Manuscrit en cours de préparation
- 2008.4 **Interference between fluorochroms as cause of labeling artifacts.**
Iobagiu C, Vedrine C, Muller C, **Lambert C.**
Etude en cours de finalisation
- 2008.5 **Immunological significance of Unconventional CD8dimmed T cell subsets in peripheral blood**
Iobagiu C, Casu L, **Lambert C**
Etude en cours de finalisation.

Répartition des travaux publiés en fonction de l'impact factor

Journaux	i.f.	Rang d'auteur (contribution)					Total
		1°	2°	3°	dernier	autres	
J. Natl. Cancer Inst.	10,165		2003				1
Arthritis rheumatol	7,414					1992	1
J. Immunol.	7,412			2004			1
Eur. J. Immunol.	6,015					1991	1
Clin. Cancer Res.	5,623			2001, 2005		2003	3
Inf. Immunity	3,721			2000			1
Immunology	3,674	1993				1989	2
J. Leukoc. Biol.	3,639					2005	1
J. Comp. Biol.	3,241				2008		1
Critical Care	3,214					2005	1
Intens. Care Med.	3,034					2000	1
Breast Cancer Res. treatment	2,879		2005				1
Transplantation	2,829		1995				1
J. Clin. Immunol.	2,736	2005					1
Cytometry A	2,552		2005				1
Cytometry B	2,552	2003, 2004, 2005, 2006		2004, 2007			6
Clin. Exp. Immunol.	2,518		1990				1
Biomarker	2,384					2005	1
J. Medical Virol.	2,232					2005	1
Pharm. Epidem. Drug Safety	2,098					2003	1
Eur. J. Surg. Oncol.	1,882			2005			1
Clin. Chem. Lab. Med	1,685		1999				1
Acta Derm. Venerol.	1,585					2000	1
Nephrol. Dial. Transpl.	1,424	1994					1
Anti-Cancer Res.	1,395			2000		2005	2
Immunol. Letter	1,241			2003			1
In Vivo	0,811			2002			1
Transplant. Proceedings	0,511	1995					1
La Rev. Med. Interne	0,475					1988	1
Contrib. Nephrol.	0,463					1993	1
Progress Urol.	0,399		2003				1
La Presse Med.	0,347	1989		1989			2
Presse Med.	0,347			1999			1
Ann. Franc. Anesthes.	0,303					Gerap (2004)	1
Nephrologie	0,286	1987, 1990		1991			3
Cell Oncol.						2005	1
Clin. Immunol. Immunopathol						1998	1
Total		11	7	10	1	16	

Contributions à congrès

Contributions à l'organisation de congrès internationaux

- 1 **Congress International Society Cell Analysis (ISAC)**
Comité scientifique, présidence d'une session
Montpellier 2000
- 2 **Congress International Society Cell Analysis (ISAC)**
Comité scientifique, présidence d'une session
Montpellier 2004
- 3 **Congrès European Society of Clinical Cell analysis (ESCCA)**
Comité scientifique, présidence d'une session
Bremer 2008
- 4 **Congress International Society Cell Analysis (ISAC)**
Comité scientifique, présidence d'une session
Budapest 2008

Contributions à l'organisation de congrès nationaux

- 1 **Congrès Français de cytométrie**
St Etienne Octobre 2001
- 2 **Atelier sur les tests allergologiques par cytométrie en flux**
Congrès Français de cytométrie; Grenoble octobre 2005
- 3 **Congrès Français de cytométrie**
Grenoble, Octobre 2005
- 4 **Journée de Prestige AFC Fluorescences et compensations en cytométrie multicolore**
Paris, Janvier 2006
- 5 **Journée thématique AFC Cellules dendritiques et immunologie**
Paris, Mars 2006
- 6 **Atelier sur les Immunodosages par cytométrie en flux**
Congrès Français de cytométrie; Bruges octobre 2006
- 7 **Congrès Franco-Belge de cytométrie**
Bruges, Octobre 2006
- 8 **Journée thématique AFC de tests d'activation des basophiles en cytométrie**
Paris Novembre 2006

- 9 **Journée de Prestige AFC tests fonctionnels en cytométrie**
Paris, Janvier 2007
- 10 **Congrès Français de cytométrie**
Clermont-Ferrand, Octobre 2007

Organisation de réunions régionales

- 1 **Accidents d'origine allergique en anesthésie**
St Etienne, Mai 1997
- 2 **Solutions d'analyse d'expression des gènes (Puces à ADN ; Bioanalyseur sur puce.)**
St Etienne, Décembre 2001
- 3 **Relation nez-bronches en allergologie**
St Etienne, Juin 2002
- 4 **Journées stéphanoises de cytométrie**
Annuels depuis 1999

Contributions orales (*congrès à comité de lecture*)

- O-1 **Evaluation of Plasma filtration by mean of a mathematic model.**
First International Meeting of Haemapheresis, Oral communication ; Dijon 1984
- O-2 **Cytokine mRNA expression studies by competitive RT-PCR.**
Congrès Européen Immuno-analyse. Turin 1998
- O-3 **Liver predominant cytotoxicity is reduced in colon tumor bearing patients who developed metastases.**
Union International Clinical Cancer, Grèce 1998
- O-4 **Immunodétection of carcinoma cells in suspension by flowcytometry.**
Congrès international de cytométrie ISAC : Montpellier, mai 2000
- O-5 **Conduite à tenir devant une hyper-éosinophilie.**
Atelier Biologie et allergologie ; Rencontres ANAFOCAL .
Journées Parisiennes d'Allergies ; Paris janvier 2004.
- O-6 **Pièges diagnostiques en pratique courante**
Atelier Biologie et allergologie . Rencontres ANAFOCAL
Journées Parisiennes d'Allergies ; Paris janvier 2004.
- O-7 **Oligoclonal Clonotypy of Undertermined Significance in immuno-monitoring**
Congrès international de cytométrie ISAC ; Montpellier, mai 2004

- O-8 **Cytometric Bead Assay of cytokines in sepsis : clinical evaluation**
Congrès international de cytométrie ISAC ; Montpellier, mai 2004
- O-9 **Bilan immunologique pour le malade allergique**
Atelier Biologie et allergologie ; Rencontres ANAFOCAL.
Journées Parisiennes d'Allergies ; Paris janvier 2005.
- O-10 **Pièges diagnostiques en pratique courante**
Atelier Biologie et allergologie ; Rencontres ANAFOCAL.
Journées Parisiennes d'Allergies ; Paris janvier 2005
- O-11 **Multicolor Flowcytometer Settings**
2° Congrès annuel de la Société Roumaine de Cytométrie Bucarest 2006
- O-12 **Clonopathie oligoclonale de signification indéterminée**
Lambert C.
3° rencontre du Cancéropole Lyon Rhone-Alpes Auvergne ; Lyon Biopole juin 2006
- O-13 **Validation d'anticorps issus de la protéomique (Cytométrie en flux + confocal).**
3° Rencontres du CLARA Echanges académiques/industriels, Grenoble 2006
- O-14 **Puissance et difficultés de la cytométrie en flux**
1° Congrès National de cytométrie de Tunisie ; Monastir Octobre 2007

Contributions Affichées

- P-1 **Dramatic raise of serum IgA in allograft recipients.**
Lambert C, Berthoux F
Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie European Dialysis,
Transplantation Association ; Glasgow 1993. poster
- P-2 **Etude phénotypique des lymphocytes des pleurésies lymphocytaires**
Contet C., **Lambert C.**, Cottier M., Fournel P., Vergnon JM, Perol M., Piaton E,
Ruesch C, Genin C.
Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie Paris 1998
- P-3 **Multiplex real-time RT-PCR for quantification of hormone receptors in breast cancer.**
Caraion-Iobagiu C, **Lambert C**, Vincent N. and Genin C.
Séminaire de biologie moléculaire. Institut Pasteur Paris 2003
- P-4 **Microsatellite analysis of estrogen receptor β locus in breast cancer.**
Caraion-Iobagiu Cristina *, N. Vincent, **Lambert C**, Caraion C., Li G and Genin C.
Congrès annuel de la Société Française de Cancerologie, Paris 2003
- P-5 **Cytological lymphocyt analysis of nasal polyposis by flowcytometry.**
Chelikh Larbi, **Lambert C**, Dumollard J-M, Genin C, Martin C, Prades J M.
Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie, St Etienne 2001

- P-6 **Unconventional T cells in routine lymphocyte analysis.**
Lambert C, Genin C.
Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie 2002
- P-7 **Real time RT-PCR for absolute quantification of hormone receptors in breast cancer.**
 Caraion C., Vincent N., **Lambert C.**, Ursoniu S., and. Genin C.
 Société française de Cancérologie. Nice 2004
- P-8 **Pseudo défaut de compensation entre les cyanines.**
Leclerc Ch., Lambert C, Saby P., Genin C.
 Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie, Grenoble, 2005
- P-9 **Modélisation de l'activation du lymphocyte T.**
 Bidot Caroline, **Lambert C**, Gruy F, Guy B.
 Rencontre Biomathématiques St Malo 2003
- P-10 **Numération lymphocytaire par cytométrie en 6 couleurs.**
Lambert C, Iobagiu C, Genin C.
 Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie, Grenoble, 2005
- P-11 **Méthode IDADIGE (Image and Data Analysis for Differential In Gel Electrophoresis)**
 Bernard F, Guerillot-Maire F, Choquet G, Lacroix B, **Lambert C**, Bay X, Gruy F, Pinoli JC.
 Cancéropole Lyon Rhone-Alpes Auvergne . Réunion annuelle Clermont Ferrand 2005
- P-12 **Outils de Validation Cytomique d'expression protéomique des adénocarcinomes**
Lambert C, Iobagiu C, Genin C, Pinoli JC*, Gruy F*.
 Cancéropole Lyon Rhone-Alpes Auvergne . Réunion annuelle Clermont Ferrand 2005
- P-13 **Clonopathies oligoclonales de signification indéterminée.**
Lambert C, Iobagiu C, Genin C
 Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie Toulouse Nov 2005
- P-14 **Modélisation de la cinétique d'activation des lymphocytes T.**
 Bidot Caroline, Gruy F, Guy B, **Lambert C.**
 Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie Toulouse Nov 2005
- P-15 **Repertoire TCR V β des sous-populations T CD4+CD8+**
 Iobagiu Cristina, **Lambert C**, Genin C
 Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie Toulouse Nov 2005
- P-16 **Outils de Validation Cytomique d'expression protéomique des adénocarcinomes**
Lambert C. Gruy F
 Rencontre du Cancéropole Lyon Rhone-Alpes Auvergne ; Lyon Biopole juin 2006
- P-17 **Analyse multicolore des adénocarcinomes par CMF**
 Stachowicz ML, Mohamed F, Iobagiu C, Genin C, **Lambert C.**
 Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie, Bruges 2006

- P-18 **Artéfacts de marquage sur sang total en CMF**
Iobagiu Cristina, Genin C, **Lambert C.**
Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie, Bruges 2006
- P-19 **TCR Vb Repertoire in CD4+CD8+ T Cell subsets**
Iobagiu Cristina, **Lambert C**, Genin C.
European Congress of Immunology. Paris Sept 2006
- P-20 **Numération lymphocytaire par cytométrie en flux 6 couleurs.**
Lambert C, Iobagiu C, Genin C
European Congress of Immunology. Paris Sept 2006
- P-21 **Mathematical modeling of T cell specific response kinetics.**
El Hentati Fatima Zhara, Bidot C, Gruy F, Guy B, **Lambert C**
European Congress of Immunology. Paris Sept 2006
- P-22 **Cinétique d'absorption du peptide HA par les cellules dendritiques CMHII**
El Hentati F-Z., Gruy F., Genin C. et **Lambert C.**
Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie Grenoble Nov 2007
- P-23 **Les lymphocytes sont-ils tous égaux devant une stimulation antigénique ?**
El Hentati F.Z., Gruy F., Genin C. et **Lambert C.**
Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie Grenoble Nov 2007
- P-24 **Cellules Treg CD4+CD25+CD127- dans le suivi de transplantation rénale.**
Abadja Farida, Michel S, Pons B, Alamartine E, Genin C, Berthoux F, Mariat C, **C Lambert**
Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie, Clermont Ferrand 2007

Contributions à ouvrages collectifs

- 1 **The relationship between Immune response to Heat Shock Proteins, raised levels of Agalactosyl IgG and mycobacteria and their role in Rheumatoid Arthritis.**
G Rook, JL Stanford, R Breadley, J Steele, **C Lambert**, PM Lydyard,
in Stress proteins in Inflammation, R Burdon, C Rice-Evans, D Blake, V Winrow ed,
Richelieu press, London, 1990.
- 2 **Effect of plasmapheresis on kinetic of Cyclosporin**
A.N Diab, **C Lambert**, K Maachi, F Berthoux.
In Rejection and tolerance, Proceedings of the 25th Conference on Transplantation and
clinical immunology. Touraine et al ed, Kluwer academic Publishers, London 1993.
- 3 **Monitoring of serum cytokines in renal transplantation : respective value of
neopterin, soluble Interleukine 2 receptor, and Tumor Necrosis Factor in
different clinical situation.**
J Hacini, F Berthoux, P Berthoux, M Vindimian, **C Lambert**, B Laurent, E
Alamartine, C Guérin.
In Transplantation and clinical immunology, 24: 165-170.
Touraine et al editor, Elsevier Science publishers. 1992.
- 4 **Numération lymphocytaire absolue par cytométrie en flux : Vers une maîtrise des
facteurs techniques de variation aléatoire.**
Lambert C, Genin C.
Immunologie de l'infection à VIH ; Biotem édition 1997 ; Paris

Textes de vulgarisation ou de valorisation

- 1 **[Les nouveaux aspects immunologiques du rejet de greffe.]**
E Alamartine, **C Lambert**, C Genin, F Berthoux.
Lyon Medit Med. 1993; 29:1343-45.
- 2 **[Numération lymphocytaire absolue par cytométrie en flux : Vers une maîtrise
des facteurs techniques de variation aléatoire].**
Lambert C, Genin C.
Feuillets de biologie 1998; 34: 13-19.

Mémoires ayant permis l'obtention de diplômes

- 1 **Dysglobulinémies monoclonales bénignes et glomérulopathies**
Diplôme de Néphrologie 1987
- 2 **Approche de l'identification de cellules effectrices de rejet d'allogreffe rénale par
analyse de leurs produits de sécrétion.**
DEA Transplantation d'organes et de greffe de tissus 1995

Rapporteur / Relecteur pour des revues

- 1 **Cytometry**
Editor Wiley-Liss,
- 2 **Wellcome Trust Limited, a company registered in England**
Application for Wellcome Research Training Fellowship
Career Schemes & Clinical Initiatives

5 – Encadrement de mémoires et thèses

Thèses de 3° Cycle en cours

Validation biologique d'un modèle mathématique de la réponse lymphocytaire T
El HENTATI Fatima-Zahra , 2006-2009 Ecole des mines de St Etienne ; (co-directeur)

Développement d'un outils d'analyse d'image et traitement des données de gel bidimensionnel pour l'étude protéomique de tumeurs du colon.

BERNARD Fabien, 2004-2007 Ecole des mines de St Etienne ; (co-directeur)

Thèses de 3° Cycle soutenues

Analyse de séquences répétitives polymorphiques des gènes des récepteurs hormonaux sexuels et leur expression génétique.

IOBAGIU Cristina; Décembre 2006 ; Université St Etienne et Université Timisoara (Roumanie)

Modélisation mathématique de la réponse lymphocytaire T spécifique à une infection virale.

BIDOT Caroline; Avril 2006, Ecole des mines de St Etienne ; (co-directeur)

Détection de cellules tumorales dans des liquides biologiques.

PASSEBOSC-FAURE Karine; Décembre 2005 ; Université St Etienne

Exploitation de signaux biologiques pour la réalisation de capteurs environnementaux.

Application à la construction d'un biocapteur à micro-algues immobilisées et d'une bio électrode à enzyme immobilisée

VEDRINE Christophe; Avril 2003, Ecole des mines de St Etienne

Interaction macrophage – cellules tumorales : rôle des cytokines dans l'immunosuppression et l'apoptose dans un modèle cellulaire humain.

HERBEUVAL Jean Philippe ; Juin 2003 ; Université St Etienne

Molecular detection of renal cancer cell.

LI Guorong ; Juin 2003 Université St Etienne

Thèses d'exercice de Médecine

Intérêt clinique de la Détection multiple d'IgE spécifiques d'allergènes chez 215 enfants

GOURGAUD Carine; Thèse de médecine déc 2000

Intérêt de la procalcitonine sérique dans le diagnostic étiologique des méningites de l'adulte.

MARJOLLET Olivier ; Déc 1999. St ETIENNE

Masters II ou DEA

Caractérisation spectrale de cristaux urinaires d'oxalate de calcium

MAHDI Sara

Master II Biophotonique de la cellule et systèmes intégrés ; Université de St Etienne ; Juin 2007

Immuno-détection de cellules tumorales en suspension dans un liquide biologique

MOHAMMED Fauzia; Juin 2006

Master II Biophotonique de la cellule et systèmes intégrés ; Université de St Etienne Juin 2006

Molécules d'adhésion et risque métastatique dans le cancer du colon.

BLANC Pierre ; Septembre 1999

DEA Sciences chirurgicales, option cancérologie Faculté de médecine Paris-Sud Université Paris XI.

Mise au point et validation d'une technique de détection de cellules cancéreuses rares dans des épanchements pleuraux par cytométrie en flux.

CONTET Carine : juin 1998

DEA Génie Biologique et médical, Lyon

Facteurs modulant la production différentielle d'IL-10 et IL-12 par les macrophages chez l'homme

RANCON Florence; DEA 1997

DEA Génie Biologique et médical, Lyon

Diplômes d'Ingénieur

Mise au point d'un protocole de détection de cellules tumorales du sein par cytométrie en flux 4 couleurs et RT-PCR en temps réel.

STACHOWICZ Marie Laure ; 2005-2006

Formation en Ingénieur biologie. EPHE Paris

Modélisation de la reconnaissance spécifique du peptide par le lymphocyte T

Claire-Sophie HAUDIN 2003

Formation en Ingénieur. Ecole Mines de St Etienne

Mise au point d'un protocole de caractérisation de sensibilité pour des allergènes. Etudes des réactions croisées pomme-bouleau

VOLATTIER Aurélie ; Aout 1999

Diplôme Ingénieur INSA Lyon

Mémoires pour obtention de Master I

Caractérisation spectrale de cellules en suspension

Aurélie MONTMARTIN

Master I Biophotonique de la cellule et systèmes intégrés ; Université de St Etienne ; Juin 2007

Phenotypc and functional characterization of peripheral CD8 dim T cells

CASU Léa, mars 2006

Master I Biologie Cellulaire et moléculaire, Oncologie.Université de Lyon 1

Caractérisation de lymphocyte T régulateurs par phénotypage 6 couleurs chez des greffés rénaux.

Solène MICHEL ; Aout 2007

BTSA Anabiotec ; ISVT Le Puy en Velay

Caractérisation de lymphocytes B circulants par phénotypage 8 couleurs

Sabine DEFAY ; Aout 2007

BTSA Anabiotec ; ISVT Le Puy en Velay

Caractérisation d'artefacts de marquages immunofluorescents pouvant mimer des phénotypes lymphocytaires atypiques.

REMUZON Elodie Décembre 2006

BTS Biochimie ; Lycée d'Alembert ; St Etienne.

Mesure de la densité membranaire de marqueurs lymphocytaires chez l'homme.

FALCONNET Cathy , Août 2006

BTSA Anabiotec ; ISVT Le Puy en Velay.

Caractérisation d'une population de lymphocytes T du sang périphérique exprimant des taux abaissés de CD8.

AYMARD Ludivine , décembre 2005

IFTAB, Université Catholique de Lyon

Mise au point d'un test de cytotoxicité anti-tumorale par cytométrie en flux 4 couleurs ;

ASMUS Antonin ; juin 2005

DUT Génie Biologique, IUT Dijon

Association de polymorphisme des microsatellites des gènes des récepteurs hormonaux comme marqueur pronostique du cancer du sein.

SITERRE Claire, février 2005

BTS Biochimie ; Lycée Honoré D'Urfé. St Etienne.

Caractérisation d'une population granuleuse périphérique à forte expression CD45.

VALOIS Jérôme, février 2004

BTS Biotechnologie ; Lycée Simone Weil, Le Puy en Velay

Mise en évidence des cryoglobulines par immunoblotting

BARONE Laetitia Février 2004

BTS Biochimie ; Lycée d'Alembert ; St Etienne.

Analyse d'expression de récepteurs hormonaux par RT-PCR en temps réel

BONNEFOY Eveline Juillet 2004.

BTSA Anabiotec ; ISVT Le Puy en Velay.

Etude de l'expression quantitative de ER α par RT-PCR en temps réel.

GIRODET Armandine, Juillet 2003

BTSA Anabiotec ; ISVT Le Puy en Velay.

Mise en évidence des antigènes caractéristiques des cellules cancéreuses dans les liquides pleuraux a l'aide de la cytométrie en flux

POMMIER Emilie, Juillet 2003

IFTAB, Université Catholique de Lyon

Analyse de la diversité Vbéta des lymphocytes T dans les liquides pleuraux tumoraux.

BUNZLI Laurence, Mai 2003

BTS Analyses BioMédicale, IFTAB Amiens

Etude de la polypose nasale : détermination de son mécanisme par analyse de cytokines produites.

ANGLARET Nadège Juin 2002

BTS Biotechnologie ; Lycée Simone Weil, Le Puy en Velay

La polypose nasale : mise au point de deux techniques immuno-enzymologiques

HABAUZIT Nathalie ; Février 2002

BTS Biotechnologie ; Lycée Simone Weil, Le Puy en Velay

Recherche d'anomalies génétiques pour les facteurs B, C4 et C2 du complément

VALENTIN Anne-Laure ; Aout 2002

IUP Ingénierie de la Santé, Montpellier

Etude de la polypose nasale. Mise au point d'une technique d'immuno-histochimie.

THOMAS Cécile. Février 2001

BTS Analyses biologiques ; Lycée la Martinière-Duchère ; Lyon

Détection de cytokine dans les liquides pleuraux tumoraux .

GOUNON Cyril, Juin 2000.

BTSA Anabiotec LEGTA Rodez.

Mise au point d'un immunodosage d'IgE spécifiques d'Ammonium Quaternaire.

IMADOUCHE Myriam. Février 1998.

BTS Biotechnologie ; Lycée Simone Weil, Le Puy en Velay

Mise au point et validation d'un protocole de purification de lymphocytes T CD4+ de liquide pleural.

MOUNIER Florence, Février 1999

BTS Biotechnologie ; Lycée Simone Weil, Le Puy en Velay

Purification et conjugaison d'anticorps spécifiques des cellules mésothéliales au fluorochrome FITC

FERRET Marlène Février 1999

BTS Biotechnologie ; Lycée Simone Weil, Le Puy en Velay

Mise au point d'un test d'adhésion de cellules tumorales coliques sur le foie.

CHEYLUS Aurélie ; Avril 1999.

BTS Biochimie ; Lycée Honoré D'Urfé. St Etienne.

5.2 Programmes nationaux et internationaux

Projets de recherche clinique

Pro-SEPS : Etude multicentrique randomisée évaluant une stratégie de prescription des antibiotiques basée sur le taux de procalcitonine chez des patients de réanimation présentant un sepsis sévère sans preuve clinique ni biologique d'infection.

REF PCT-F-2005-10, N° CCPPRB 06005

Médecin investigateur : Pr D ANNANE –Réanimation, Hôpital R Poincaré, Garches

Microbiocapteur pour la détection multiparamétrique quantitative de cellules tumorales

Appel d'offre INCA « Cancer : détection d'innovations » 2006 N°: 54

Coordinateur du projet : M. Claude LAMBERT

CIRTACI :Exploration des réactions d'anaphylaxie aux produits de contraste en imagerie : conséquences sur la prise en charge des patients allergiques.

PHRC N° AOM 03 150. 2005

Médecin investigateur :Pr O. CLEMENT ; Hop G Pompidou ; APHP Paris.

Validation d'une méthode d'analyse moléculaire quantitative des récepteurs hormonaux et du HER2/neu dans le cancer du sein.

PHRC Régional N° action : O301054 ;

Médecin investigateur : Dr C LAMBERT

NODDICAP : Identification de marqueurs tumoraux pour le diagnostic et du suivi des cancers du sein et du côlon

Responsable scientifique : Dr Geneviève CHOQUET-KASTYLEVSKY ; bioMérieux. Lyon

Evaluation des performances de techniques de biologie moléculaire et de l'association cytologie-biologie moléculaire dans les diagnostics préopératoires difficiles de l'adénocarcinome rénal.

Appel d'offre CHU St Etienne 2002. N° action : O208131

Médecin investigateur : Pr J. TOSTAIN

Pleurésies malignes : apport des techniques de cytométrie.

PHRC 1996 ; N° d'Action : 9701016

Médecin investigateur : Pr C. GENIN

Collaborations de recherche

Biosafety Surveillance Committee (International Society of Analytical Cytometry)

Nouvelles recommandations de biosécurité d'utilisation des trieurs par cytométrie en flux.

Coordination Ingrid Schmidt

http://www.isac-net.org/index.php?option=com_content&task=view&id=33&Itemid=42

Biosafety Task Force : Ingrid Schmid, Chair, Albert Donnenberg, Barry Bredt, **Claude Lambert**, Stephen Perfetto.

European Network for Invitro Diagnosis of Allergy Euro-BAT : Groupe Européen de standardisation et validation de méthodes diagnostic cellulaires in vitro des allergies.

Groupes Européen en cours de constitution. Coordination Claude LAMBERT ; Alain De WECK

Epidémiologie des réactions anaphylactiques et anaphylactoides peranesthésiques en France. Septième enquête multicentrique 2001-2002.

Mertes PM, Laxenaire MC et les membres du GERAP

6 - Responsabilités

6.1 Locales:

Nous avons des engagements communautaires

Au sein du Pole de Biologie-Pathologie du CHU de Saint-Etienne

- Bureau du pôle
- Conseil médical restreint

Au sein du Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne

- Commission Médicale Consultative du CHU depuis 2007
- Représentant du CHU à la CME de l'Institut de Cancérologie de la Loire depuis 2007
- Délégation Régionale de Recherche Clinique et de l'innovation (DRCI)
- Sous-Commission de Soutien aux techniques innovantes et coûteuses (STIC)
- Membre (co-rapporteur) du groupe d'autoévaluation GT1 « Politique et qualité du management : orientations stratégiques de l'établissement) dans le cadre de la certification V2 du CHU.
- Groupe de travail sur l'informatisation des laboratoires du CHU

Au sein de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

- Membre du comité de direction du Centre Ingénierie et Santé
- Membre du comité pédagogique

Au sein de l'Institut Fédératif de Recherche IFR 143 IFRESIS

- Membre du conseil scientifique

6.2 Régionales:

Nous sommes représentant de la communauté stéphanoise dans

- Comité scientifique d'interface entre Cancéropole et LyonBiopole

6.3 Nationales:

Nous sommes membre de comités de sociétés savantes, notamment de cytométrie analytique :

- Association Française de Cytométrie
 - membre du bureau depuis 2003
 - trésorier depuis 2004

6.3 Internationales:

Comités scientifiques de congrès internationaux

- ISAC Comité scientifique du congrès 2000 Montpellier, 2008 Budapest;
- ISAC Biosafety committee
- ESCCA Comité d'organisation du congrès annuel de Brême 2008,

Groupes de travail internationaux

Groupe européen de validation des tests cellulaires pour le diagnostic des allergies.

- Comité scientifique : Maria Louisa SANZ (Espagne), Marta FERRER(Espagne), Lina MAYORGA (Espagne), Didier EBO (Belgique), Edward KNOLL (Hollande), Hans J HOFFMANN (Danemark), Jean SAINT-LAUDY (France) et **Claude LAMBERT**.
- Buts :
 - Standardisation des méthodes analytiques de tests allergiques in vitro.
 - Validation clinique par des études multicentriques
 - Proposition de « Guidelines » consensuelles
 - Soutient technique pour le transfert de ces techniques
- Organisation d'ateliers européens :
 - Pamplona in October 2007
 - St Etienne France, October 2008**

Parrainage de nouvelles sociétés de pays émergents :

- Société de cytométrie de Roumanie
(Relations étroites avec les équipes de ST Etienne. Pr Lydia CAMPOS, vice-présidente de la société Roumaine)
- Société de cytométrie de Tunisie
(La région de Monastir est parrainée à la Région Rhône-Alpes).
- En projet en Lybie
- En projet dans les pays francophones d'Afrique de l'ouest
sous l'égide de l'Association Française de Cytométrie

7 - Enseignement

Immunologie :

Master I Biologie fonctionnelle et Biophotonique :

Module « Physiopathologie des Maladies Transmissibles »

➤ Module 8 :

Modèle d'infection systémique : le choc septique

Enseignants : Zeni F., Ros A., **Lambert C.**

➤ Module 11 :

Infections respiratoires en réanimation : les pneumonies à *Pseudomonas aeruginosa*

Enseignants : Auboyer C., Berthelot P., Grattard F., **Lambert C.**

Cours d'immunologie fondamentale et techniques biologiques

Cours annuels adressés aux externes, internes en stage au Pôle de Physiologie-Pathologie.

Allergologie

Dans le cadre de la formation médicale continue, Association des allergologues de la Loire (AFIMAL)

- Méthodes biologiques de diagnostic de sensibilisation aux allergènes 2005
- Tests cytométriques d'allergies (tests d'activation des basophiles) Mars 2006

Ateliers formation médicale continue, Association Française des allergologues (ANAFORCAL)

- Biologie en allergie : les pièges diagnostic pratique courante Paris, Janvier 2004
- Conduite à tenir devant une hyperéosinophilie ? Paris, Janvier 2004
- Biologie en allergie : les pièges diagnostic pratique courante Paris, Janvier 2005
- Quel bilan immunologique pour le patient allergique ? Paris, Janvier 2005

- Enseignement post-universitaire de l'association des Radiologues de la Loire
St Etienne, Mars 2005.

Risques et conduite à tenir en cas d'Accidents anaphylactoïdes après injection de produits de contrastes

(invité : Pr O. Clément; Hop G Pompidou Paris).

- Enseignement post-universitaire de l'association des anesthésistes –Réanimateurs de la Loire
St Etienne, Mars 2004

Risques et conduite à tenir en cas d'Accident anaphylactique per-anesthésique

(invité : Pr F Leynadié, Paris)

Diffusion d'un protocole et d'une trousse d'urgence (en action dans les services de soins et diagnostic de la Loire depuis 2004)

Biotechnologie

au Centre Ingénierie et Santé

Dans le cadre de la nouvelle filière de Ecole Nationale Supérieure des Mines de St Etienne, créée en octobre 2006,

Objectif de l'enseignement en Ingénierie et Santé est de délivrer une formation originale s'appuyant sur des connaissances et méthodes du monde biomédical qui viennent compléter les enseignements en sciences pour l'ingénieur : axe IBIS suiv de 3 profils d'option:

- 1/ Biomatériaux – Biomécanique,*
- 2/ Génie Hospitalier: Organisation et gestion secteur santé*
- 3/ Imagerie et modélisation.*

Nous participons à l'enseignement de la partie biologique et biotechnologique dont les objectifs spécifiques sont :

Comprendre les processus de fonctionnement, de vie et de mort, de reproduction ou d'organisation dans les organes pour en appréhender les paradigmes et contraintes de tous contextes biologiques ou touchant à la santé.

Les cellules sont également des outils d'évaluation et même de traitement. Les méthodes d'explorations seront donc brièvement abordées.

Unité pédagogique, UP 1 Biologie, 2e année.

Responsable : Claude Lambert

– Introduction sur les applications potentielles biotechnologiques dans la santé :
prothèses, instrumentation, tissus et organes artificiels...

- Principaux constituants (noyau, squelette) et mécanismes de fonctionnement cellulaire (besoins environnementaux et énergétiques..), informations génétiques, communication, reproduction, mort.

- Constitution des tissus et organes. Relation entre la cellule et son environnement.
- Principes et technologies d'analyses biologiques des cellules pour une compréhension critique des validations médicales.

Unité pédagogique, UP 3 Biotechnologie , 2e année.

Responsable : Marie Hélène Lafage-Proust ; Claude Lambert

- Outils d'étude (Animaux, cultures, lignées, clones, etc.)
- Cellules comme outils thérapeutiques (greffe, transfert, etc.)
- Gène comme outils d'étude, Biotechnologie, biopuces
- Validation scientifique, publication, lecture critique
- **Biomatériaux / Ingénierie tissulaire (7h30)**
 - Tolérance immunologique, rejet, allergie
 - Biomatériaux Vasculaire (prothèses, valves, circuits extra-corporels),
 - Divers : Colles biologiques, Cristallin, Cathéters, chambres, pompes, stimulateurs...

Cytométrie :

- Technique (principes ; réglages ; compensations, pièges, artefacts..)
- Immunologie (phénotypage, tests fonctionnels) ;
- Assurance qualité
- Organisation d'ateliers, Journées thématiques, congrès.

Sous l'égide de l'Association Française de Cytométrie

Organisation des réunions régionales

Nous avons créé et organisons annuellement depuis 9 ans (première réunion en 2001) un colloque régional de cytométrie médicale dont les présentations sont éditées sous forme de CD-ROM.

Journée Stéphanoise de Cytométrie en Flux.



Membre des comités d'organisation de congrès nationaux

Nous avons organisé plusieurs réunions nationales dans le cadre de l'Association de cytométrie :

- St Etienne (2001),
- Grenoble (2005),
- Bruges (2006),
- Clermont Ferrand (2007),
- Nancy (2008)

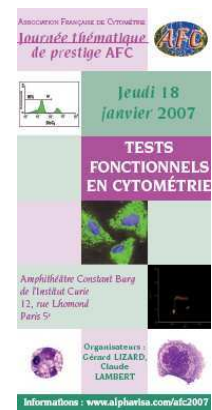
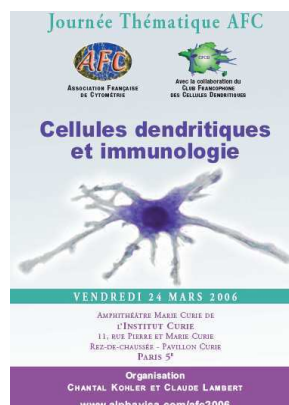


Organisateurs **d'Ateliers technologiques** au cours de congrès nationaux.

- Allergie, Grenoble 2005 ;
- Immunodosages multiplexes, Bruges 2006 ;
- Immunomonitoring Clermont-Ferrand, 2007),

Coorganisateur de **journées thématiques** de formation continue

- Compensations de fluorescence, Paris janvier 2006 (avec M Maynadié, Dijon)
- Cellules dendritiques, Paris mars 2006 (avec C Kohler, Nancy)
- Tests fonctionnels, Paris novembre 2007 (avec G Lizard, Dijon)



- Test d'activation des basophiles par cytométrie en flux à
Paris Novembre 2006, avec Olivier LEES



Membre des comités d'organisation de congrès internationaux

- Membre du conseil scientifique du congrès ISAC 2000, 2004 et 2008
- Membre du conseil d'organisation du congrès ESCCA Bremer 2008

8th Euroconference on Clinical Cell Analysis (Page 1 of 5) Bremen, Germany, 18 - 20 September 2008

comité : Gregor Rothe (chair; Allemagne), János Kappelmayer (Hongrie), Ulrich Sack (Allemagne), Jan Gratama (Hollande), Mariam Klouche (Allemagne) ; **Claude Lambert**; Bruno Brandi (Italie).

Soutien aux pays émergents pour la structuration de sociétés et l'organisation de congrès :

- Premier **congrès national Roumain** de Cytométrie (Bucarest Mai 2006)
Organisé par Adriana DUMITRESCU ; Daniela BRATOSIN et Viviana ROMAN,
- Première **journée nationale Tunisienne** de cytométrie à Monastir 26-27 Novembre 2007.
Organisé par Mahjoub AOUNI ; Rafik HARRATH ; Salma FEKI (membre AFC) et Nejia BRAHAM.
Membre du comité d'organisation. orateur Invité

Biologie moléculaire :

Formation permanente annuelle depuis 2000 pour étudiants et techniciens CHU

Cours de biologie moléculaire et techniques biologiques

Techniciens spécialisés, externes, internes en stage au pôle de Biologie-Pathologie.

Coordinateur : Claude LAMBERT ; Nathalie RAT

Programme type du cours de biologie moléculaire.

Initiation à la PCR : de la théorie à la pratique 23 et 24 Janvier 2007	
1° partie Théorie : Mardi 23 janvier 2007 Salle de cours, Plateau de biologie niv +2, Hôpital Nord	2° partie Théorie : Mercredi 24 janvier 2007 Salle de cours, Plateau de biologie niv +2, Hôpital Nord
13h45 : Accueil	14h00 - 14h45 : méthodes d'extraction Principes, méthodes, qualité, Docteur Anne CARRICAJO, Bactériologie, Bellevue
14h00 - 15h30 : Qu'est-ce que l'ADN ? Structure, replication, polymérase, Professeur Jacques BORG, Biochimie	14h50 - 15h35 : Applications de la PCR : Avantages et limites des différentes méthodes Bactériologie, virologie, Docteur Florence GRATTARD, Bactériologie, Nord.
pause 10 minutes 	pause 10 minutes 
15h40 - 16h30 : Génétique Le gène, les mutations, pourquoi faire des PCR? Docteur Renaud TOURAINE, Génétique	15h45-16h30 : RT-PCR Principe, extraction ARN, Transcription inverse Docteur Claude LAMBERT, Immunologie.
16h40 - 17h30 : Qu'est-ce que la PCR ? Extraction ADN, Amorces, principes de PCR, analyse produits, Docteur Pascale FLANDRIN, Hématologie	16h30 - 17h30: Bonnes pratiques, applications virologiques Pour une PCR fiable, éviter les contaminations, décontaminer... Docteur Thomas BOURLET, Virologie
Informations : Nathalie RAT, Sandrine DUMOULIN, Pascal GROS, Sylvie MOREL, Dominique RICHET, Philippe TROY, Dr. Claude LAMBERT.	2° partie : 1 journée dans un laboratoire. Labos d'accueil : Bactériologie BV : Dr. Anne CARRICAJO Bactériologie : Hop Nord : Dr. Florence GRATTARD Hématologie : Dr. Pascale FLANDRIN Virologie Hop Nord : Dr. Thomas BOURLET Immunologie : Dr. Claude LAMBERT Néphrologie : Dr. Lise THIBAUDIN Parasitologie : Dr. Pierre FLORI

Informatique Bureautique :

Formation médicale continue depuis 1999 pour praticiens hospitaliers

Cours de bureautique

- Préparer une présentation orale pour un congrès
Principes ; diaporama avec Power point.
- Préparer une présentation affichée pour congrès
Principes ; construction d'un poster A0 avec Power-Point.

8 - Publications représentatives

Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs 4 color staining : a clinical evaluation of a new Flowcytometer.

Lambert C, Iobagiu C, Genin C

Cytometry B Clin Cytom. 2006 Jan;70(1):29-38.

Persistent Oligoclonal CD4dimCD8+T cells in peripheral blood

Lambert C, Iobagiu C, Genin C

Cytometry B Clin Cytom. 2005; 66B 10-17.

Significance of Unconventional CD4+CD8dim T cell subsets.

Lambert C, Ibrahnm M, Iobagiu C, Genin C.

J Clin Immunol 2005 Sep;25(5):418-27.

Mathematical modeling of T-cell activation kinetics

Bidot C, Gruy F, Haudin C-S, El Hentati F, Guy B, and **Lambert C**.

Journal of Computational Biology – accepté (JCB-2007-0125).

Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis.

Herbeuval JP, **Lambert C**, Sabido O, Cottier M, Fournel P, Dy M, Genin C.

J Natl Cancer Inst. 2003; 95(8): 611-21

Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6.

Herbeuval JP, Lelievre E, **Lambert C**, Dy M, Genin C.

J Immunol. 2004 Apr 1;172(7):4630-6.

Evaluation of a panel of molecular markers for the diagnosis of malignant serous effusions

Passebosc-Faure K, Li G, **Lambert C**, Cottier M, Gentil-Perret A, Fournel P, Perol M, Genin C.

Clin Cancer Res. 2005 Oct 1;11(19 Pt 1) : 6862-7.

MN/CA9: a potential gene marker for detection of malignant cells in effusions.

Li G, Passebosc-Faure K, Feng G, **Lambert C**, Cottier M, Gentil-Perret A, Fournel P, Pérol M, Genin C.

Biomarkers. 2007;12(2):214-20.

Flow-cytometry versus Histamine release tests analysis of In vitro Basophil Degranulation in Allergy to Hymenoptera venom.

C. Lambert, L. Guilloux, C. Dzviga, C. Gourgaud-Massias, C. Genin.

Cytometry. 2003; 52B(1): 13-9.

High sensitivity and specificity of serum procalcitonin levels in adults with bacterial meningitis.

Viallon A, Zeni F, **Lambert C**, Pozzetto B, Tardy B, Venet C, Bertrand JC.

Clin Infect Dis. 1999; 28(6): 1313-1316.

9 - Perspectives

Notre activité se poursuit dans les trois thématiques principales (1 - mesure de la réponse immunitaire, 2 - interactions entre immunologie et cancers et 3 - développements biotechnologiques), dans la continuité des travaux décrits précédemment. Certains projets font l'objet de demandes de financement et de stages pour des étudiants en master, thèse, post-doctorat.

1 – Mesure de la réponse immunitaire

1.1 – Diversité lymphocytaire

La protection de l'organisme contre des agents extérieurs dépend de la largeur du spectre de reconnaissance des sous-populations de lymphocytes T. Une large diversité devrait donc correspondre à une meilleure protection. Nous pensons qu'une restriction de cette diversité pourrait induire des troubles immunitaires avec déficits contre certains antigènes et réactions inappropriées contre d'autres. Les restrictions peuvent être expliquées par élimination (effets toxiques, super-antigènes) ou par négligence (insuffisance de sollicitation). Les surexpressions peuvent être expliquées par des stimulations persistantes et peu variées et la faible compétition et éventuellement conduire à une réponse inappropriée (ex : hypersensibilité de type IV ou auto-immunité)

Dans certains cas extrêmes, une population clonale pourrait persister longtemps, soit par maintien de la stimulation (ex. stimulation chronique), soit par échappement des mécanismes d'homéostasie. Ces derniers peuvent exposer à une expansion incontrôlée. C'est la réflexion que nous avons eu sur les risques potentiels de ce que nous avons dénommé OCUS par analogie aux MGUS des lymphocytes B.

Distribution clonotypique dans une population de patients

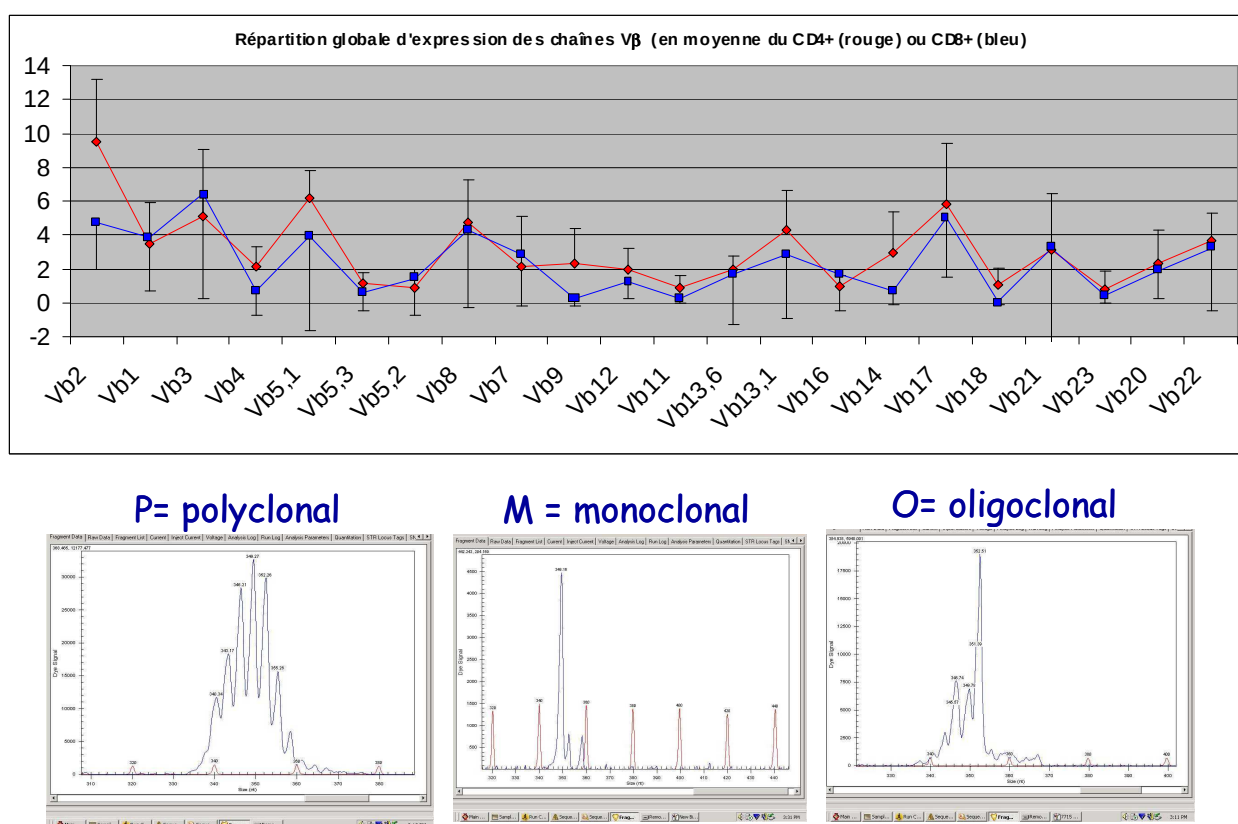
Nous avons analysé la diversité des chaînes V β du récepteur TCR par cytométrie en flux en utilisant les anticorps anti-clonotypes disponibles dans un groupe de donneurs de sang (fig 12a).

Nous remarquons que toutes les chaînes V β ne peuvent pas être étudiées par manque d'anticorps.

Nous avons observé que certains clonotypes (ex : V β 9 ; V β 14) sont bien moins exprimés par les lymphocytes T CD8 comparés aux lymphocytes T CD4+. La signification de ces différences n'est pas connue et pourrait avoir un intérêt scientifique évident.

Figure 12 : a – Représentation des chaînes V β du TCR par les populations lymphocytaires T périphériques conventionnelles (CD4+ - courbe rouge- ou CD8+ -courbe bleu-) chez 29 témoins sains.

b – Analyse spectrale de la longueur du segment CR3 du TCR V β (spectratyping) par électrophorèse capillaire (Beckman Coulter sequencer), après tri cellulaire (Facs Aria ; BD Biosciences).



Nous avons pu confirmer la restriction clonale de certaines sous-populations par analyse de distribution de longueur de la région CDR3 de la partie variable du récepteur T (méthode immunoscope -fig 12.b-).

Il serait alors intéressant de voir si ces déficits sont liés à l'environnement du sujet, par exemple en comparant des sujets fortement exposés ou sous exposés à des stimulations antigéniques. Une étude pourrait se faire en comparant des germains vivant en pays industrialisés ou en pays

émergent. Nous souhaiterions également suivre l'exposition prolongée à des atmosphères confinées comme les dans les missions spatiales ou Concordia (au pôle sud). Cette étude permettrait de tester l'hypothèse « hygiéniste » qui a été proposée pour expliquer l'augmentation des risques d'allergie ou d'autoimmunité dans les pays industrialisés (« overclean countries » hypothesis). Cette hypothèse est séduisante mais évidemment non univoque et encore discutée.

Une meilleure connaissance de cette diversité clonotypique aurait donc de multiples intérêts mais les outils restent encore trop coûteux pour l'analyse de grands nombres d'échantillons.

1.2 – Dynamique de réponse lymphocytaire T:

Afin de valider notre modélisation mathématique de la dynamique de la réponse spécifique des lymphocytes T, nous avons initié des études expérimentales destinées à produire des données numériques. Devant la très grande difficulté pour suivre des lymphocytes T humains spécifiques circulants en quantité suffisante, nous nous sommes tournés vers des modèles murins. Nous avons entrepris une étude de stimulation de lymphocytes T transgéniques (souris HNT-TCR) restreint au CMH I-Ad, spécifiques d'un peptide de l'hémagglutinine du virus grippal (HA110–119 peptide IYSTVASSL ; don de R. LIBLAU unité INSERM 563, Toulouse).

Nous avons commencé à quantifier la présentation d'antigène par des cellules présentatrices. Après purification des cellules dendritiques autologues de souris HNT-TCR à partir de la rate, les cellules sont enrichies par tri magnétique, stimulées avec des facteurs de croissance (GM-CSF et IL-4) puis incubées avec le peptide. La **quantité de peptide adsorbé** est mesurée par chromatographie en phase solide suivie de spectrométrie de masse. Les résultats préliminaires montrent qu'un maximum de peptide est absorbé dans les 10 premières minutes.

La **dynamique de stimulation in vitro** des lymphocytes T spécifiques sera analysée après contact avec les cellules dendritiques chargées à plusieurs niveaux par le peptide d'intérêt. La stimulation est analysée par cytométrie en flux. Nous souhaitons suivre l'expression membranaire de CD3, CD28, CD4/CD8, CD25 et CD69 impliqués dans le modèle ainsi que la division cellulaire après marquage des cellules par le Succinyl Ester de Carboxy Fluoresceine (CFSE).

Nous envisageons une **étude in vivo** chez la souris HNT-TCR pour suivre la réaction des lymphocytes T spécifiques dans le ganglion drainant la zone d'injection du peptide et la rate en présence d'adjuvants. Cette étude nous permettra de consolider les résultats in vitro et de fournir également des données spatiales (délais de migration, probabilité de rencontre) dans les

structures anatomiques.

Par la suite, nous souhaitons faire la même étude sur un autre modèle d'animal transgénique pour le CMH humain (don de F Lemonnier, Institut Pasteur Paris) soit

- de **classe I** : (souris HHD II et K-D- β 2m-). La réponse T spécifique peut être suivie en utilisant **HLA A2**.
- de classe II humain (H2-/- HLA-DR1).

Nous testerons les peptides pp65 du cytomégalo virus et HH du virus grippal et suivrons la réponse lymphocytaire T spécifique en utilisant des tetramers.

1.3 – Etudes cliniques des OCUS

Nous avons montré que certains patients exprimaient des lymphocytes T non conventionnels en quantité importante. La persistance d'une population de diversité très restreinte nous fait craindre un défaut de dérégulation de la réponse lymphocytaire ou une sollicitation excessive et prolongée par un antigène. Ces deux mécanismes pourraient favoriser l'émergence d'un syndrome lymphoprolifératif monoclonal, au moins chez une fraction des porteurs de cette anomalie. Nous souhaitons donc suivre de tels patients afin d'évaluer ce risque et de rechercher d'éventuels critères prédictifs.

Nous avons commencé une étude de **suivi longitudinal de patients** de néphrologie qui ont une analyse annuelle dans le cadre de leur suivi habituel de transplantation. Pour répondre à la demande de collègues d'autres centres, nous souhaitons étendre cette surveillance en proposant une **étude multicentrique** sous forme d'un registre de sujets qui présentent une forte population d'OCUS (au moins 5% de la population lymphocytaire T), caractérisation clonotypique, du suivi et éventuellement de la constitution d'une cellulothèque dans le cadre du Centre de Ressource Biologique. Cette étude pourrait être menée au niveau européen, sous couvert de l'approbation des comités d'éthiques et des contraintes juridiques des différents pays qui souhaitent participer.

Nous souhaiterions également pouvoir effectuer le même suivi chez des **sujets en bonne santé** porteurs de l'anomalie, qu'il s'agisse de donneurs de sang ou de la cohorte stéphanoise PROOF (Jean Claude BARTHELEMY) qui comprend 1000 sujets saines suivis depuis 6 ans selon une démarche volontaire, pour différents marqueurs cliniques et biologiques. Ces études doivent au préalable être soumises à l'approbation du comité d'éthique ou du comité de protection.

- L'émergence d'OCUS de phénotype non conventionnel (ex T CD4+ et CD8+ ou T CD8dim) est assez facile à détecter. Nous suspectons la présence d'autres types d'OCUS de phénotypes conventionnels plus difficiles à détecter s'ils sont mélangés au sein de la population globale. Nous pensons qu'une **analyse plus fine des phénotypes lymphocytaires T à l'aide de cytomètres à 8 couleurs** en ajoutant des marqueurs de maturité (ex CD27, CD28, CD127) ou de fonctionnalité (ex : CD107 ; CD25 ; CD45RO..) nous permettra une meilleure sensibilité de détection. Nous souhaitons donc mettre au point un marquage complet de populations lymphocytaires T et l'évaluer sur des populations de donneurs sains et de patients présentant des troubles immunitaires.

Il a été rapporté que certains OCUS étaient spécifiques du CMV (Sun ; Eur J Immunol 2001), et que de nombreux syndromes lymphoprolifératifs à lymphocytes T étaient dérivés de lymphocytes T anti-CMV (Orfao A ; Conférence ESCCA Oct. 2007). Il a été montré par ailleurs que les infections chroniques à CMV s'accompagnaient d'une réaction forte et durable des lymphocytes T $\gamma\delta$ périphériques (J Dechanet-Merville ; Conférence O11, Congrès Nationale SFI Nov 2007) et que cette stimulation prolongée d'activité cytotoxique était associée à une réduction de risque de cancer. Nous souhaitons rechercher une association entre la présence d'une **infection à CMV**, l'élévation de la **lymphocytose T $\gamma\delta$** (particulièrement les T autres que $\gamma 9$), **une OCUS** et la survenue de **cancers épithéliaux** dans les deux cohortes précédentes.

1.4 – Mise au point d'un « cytokinogramme »:

L'implication des cytokines dans les réponses immunitaires a été largement démontrée. De nombreuses cytokines ont été décrites, avec des rôles physiopathologiques différents mais souvent redondants. Certaines de ces cytokines ont une activité endocrine et sont détectables de façon reproductible dans le sérum ou plasma des patients au moment des poussées actives de maladies.

Cependant, il nous semble que l'analyse unitaire des cytokines par dosage dans le sérum chez des patients en cours de syndromes inflammatoires aigus n'a pas vraiment de sens, compte tenu de ces redondances. Il nous paraît plus logique d'interpréter une réaction inflammatoire dans un contexte multiparamétrique avec des **dosages multiples de cytokines**, comme cela est couramment pratiqué pour l'interprétation de la fonction rénale ou l'homéostasie hydro-ionique. Nos connaissances sont encore trop insuffisantes pour anticiper un algorithme d'interprétation ou proposer des applications cliniques pratiques mais nous pensons disposer maintenant des outils

et des méthodes pour aborder cette problématique. Nous proposons dans une première approche d'évaluer l'apport d'un panel incluant : IL-8, TNF α , IFN γ , IL-2, IL-15, IL-6, IL-1 RA et IL-10 en association avec la procalcitonine, dans certains contextes cliniques aigus comme des infections sévères (choc septique, infection virale aigue, tuberculose, infection bactérienne localisée), des syndromes inflammatoires non infectieux (maladies auto-immunes, sarcoïdose) en les comparant avec des sujets en bonne santé.

1.5 – Groupes Européens de travail sur l'immunomonitoring:

Nous souhaitons poursuivre notre démarche de consensus sur des procédures de standardisation des méthodes de surveillance de la réponse immunitaire pour permettre leur transfert vers les soins et la surveillance de patients. Nous nous proposons de dynamiser les **groupes de travail** existants ou en cours de création dans le domaine :

- de l'allergie (tests d'activation des basophiles .) : groupe **Euro BAT**
- de la réaction lymphocytaire T groupe **Euro Lympho**
- des polynucléaires neutrophiles et de la phagocytose : groupe **Euro Poly**

Nous avons déjà programmé des réunions de travail sous forme d'ateliers, à St Etienne (Lymphocytes T en juin 2008 ; Basophile en Octobre 2008) et en satellite à des congrès européens (EAACI Barcelone 2008 ; peut-être EFIS 2009).

2 – Immuno- cancérologie

2.1 – Développement technologique

Nous continuons de tester des méthodes multiparamétriques d'analyse de cellules tumorales:

- par **cytométrie en flux 5 couleurs**: validation de notre protocole actuel et évolution possible avec l'apport du 3^e laser (possibilité de marquages nucléaires, marquages de molécules d'adhésion, d'agressivité...).
- **ELISPOT à 2 ou 3 couleurs** en utilisant des marqueurs fluorescents. Des demandes de financement sont en cours pour acquérir l'instrument adapté à cette technologie. .

Nous pourrons ensuite comparer les intérêts de ces deux techniques sans leurs champs d'applications respectifs.

2.2 – Tests de nouveaux marqueurs:

Nous continuons à analyser et valider les nouveaux anticorps qui ont été produits dans le cadre de la collaboration avec bioMérieux, sur des lignées cellulaires tumorales bien caractérisées.

Nous souhaitons ensuite tester leurs spécificité et sensibilité en comparant des échantillons tumoraux natifs, de différentes origines et des échantillons inflammatoires non tumoraux.

3 – Biotechnologie

Nous continuons à développer un **instrument original multiparamétrique** de détection de cellules rares retenu parmi les projets prioritaires du plan 2008-20012 du canceropole **CLARA** Axe n°1 « Nanotechnologies, Imagerie & Cancer ».

Dans le cadre de stages d'ingénieurs (université technologique de Compiègne) ou de techniciens supérieurs, nous testerons et optimiserons

- la méthode d'immunocapture par greffage sur le substrat en quartz
- la partie imagerie : analyse multicolore ; reconstruction, analyse dynamique (vitesse d'accrochage, décrochage éventuel).

Nous pourrions ensuite proposer des études d'application de notre prototype dans des appels d'offre destinés au stade de preuve de concept.

Nous souhaitons tester notre prototype dans différentes problématiques d'évènements rares :

- cellules tumorales d'adénocarcinome (lignées puis échantillons cliniques..)
- lymphocytes T spécifiques de peptide

et éventuellement :

- cellules circulantes infectées
- maladie résiduelle de leucémie
- cellules fœtales