



HAL
open science

Développement d'un outil d'analyse de biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de la réponse au traitement médicamenteux du cancer de la vessie

Marine de Paoli

► **To cite this version:**

Marine de Paoli. Développement d'un outil d'analyse de biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de la réponse au traitement médicamenteux du cancer de la vessie. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-00918457

HAL Id: dumas-00918457

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00918457v1>

Submitted on 13 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2013

N°

DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL D'ANALYSE DE BIOMARQUEURS
POUR LE DIAGNOSTIC, LE PRONOSTIC ET LE SUIVI DE LA
REPOSE AU TRAITEMENT MEDICAMENTEUX
DU CANCER DE LA VESSIE

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

Marine DE PAOLI

Née le 24 juillet 1989 à Echirolles (38)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE *

Le 12 décembre 2013

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Pr Michel SEVE, PharmD, PhD

Directeur de thèse : Dr Christophe MARQUETTE, PhD

Membres : Dr Jean BRETON, PharmD, PhD

Pr Patrice FAURE, MD, PhD

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2013

N°

DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL D'ANALYSE DE BIOMARQUEURS
POUR LE DIAGNOSTIC, LE PRONOSTIC ET LE SUIVI DE LA
REPOSE AU TRAITEMENT MEDICAMENTEUX
DU CANCER DE LA VESSIE

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

Marine DE PAOLI

Née le 24 juillet 1989 à Echirolles (38)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE *

Le 12 décembre 2013

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Pr Michel SEVE, PharmD, PhD

Directeur de thèse : Dr Christophe MARQUETTE, PhD

Membres : Dr Jean BRETON, PharmD, PhD

Pr Patrice FAURE, MD, PhD

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**
Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2013-2014

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=12)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEURS EMERITES (n=2)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



MAITRES DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

BEDOUC	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)

PROFESSEURS CERTIFIES (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
-----------------	---------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=3)

CHANOINE	Sébastien	Pharmacie Clinique (UF-CHU)
GARNAUD	Cécile	Parasitologie-Mycologie
VAN NOLLEN	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DNTP-BGM)

MEDAILLES D'OR D'ANNEE D'INTERNAT SUPPLEMENTAIRE (n=2)

BERNARD	Delphine	période de 6 mois – novembre 2013 à avril 2014
GAUTIER	Elodie	période de 6 mois – mai 2014 à novembre 2014

ATER (n= 3)

BRAULT Julie	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
GRAS Emmanuelle	ATER	Physiologie-Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)

MONITEURS ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=11)

BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
BOSSON	Anthony	(01-10-2013 au 30-09-2015)	Laboratoire GIN
CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
CHRISTEN	Aude	(01-10-2013 au 30-09-2015)	
CRESCO	Xenia	(01-10-2013 au 30-09-2015)	LBGE

Dernière mise à jour : 18/10/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE : Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 76 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Pharmacochimie (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-11-2011 au 31/10/2014)	Laboratoire HP2(JR)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2(JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)

PROFESSEUR INVITE

NURISSO	Alessandra	(01/11/13 au 31/12/2013)
----------------	-------------------	--------------------------

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

Un grand merci...

A Christophe Marquette pour avoir accepté d'encadrer cette thèse et pour son aide dans la rédaction du manuscrit. Merci aussi pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet et de le continuer en thèse.

A Jean Breton pour son soutien et ses précieux conseils tout au long de mes études et pour m'avoir permis de suivre le parcours IDIV.

A Michel Sève pour avoir accepté de présider ce jury et pour m'avoir ouvert les portes de la filière biotechnologie.

A Patrice Faure pour avoir accepté de faire partie du jury et de juger ce travail.

A l'équipe GEMBAS et AXO Science pour leur accueil et leur convivialité. Merci à Stéphanie, Ophélie, Guillaume, Cloé, Céline, Julie et tous les autres. Je me réjouis de rester à vos côtés pour trois années encore.

A tous mes amis pharma pour ces belles années d'études. Merci à Ariane, Caro, Gladys, Pascal, Anaïs, Maelle, Amandine, Thomas et Charlotte (ma coloc' préférée !) pour tous ces bon moments passés ensemble.

A Lim Siew Woon pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir son métier. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré et pour m'avoir transmis ta passion pour l'oncologie.

A ma famille pour son soutien et pour avoir été présente dans tous les moments. Merci à mes parents et à mon frère sans lesquels je ne serais pas arrivée jusqu'ici, à ma mère pour ses relectures et son aide constante.

Last but not least, merci à Charlotte qui fait aussi partie de la famille. Merci pour tout !

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	11
INTRODUCTION.....	12
PARTIE I – LE PROJET DIPROMON.....	13
PARTIE II – LE CANCER DE LA VESSIE.....	17
1. Epidémiologie.....	17
2. Classifications des tumeurs de la vessie.....	20
3. Diagnostic.....	24
4. Surveillance.....	25
5. Prise en charge thérapeutique.....	27
5.1. Traitement des TVNIM (Ta, T1 et CIS).....	27
5.2. Traitement des TVIM non métastatiques.....	28
5.3. Traitement des cancers métastatiques.....	28
6. Besoins d’optimisation de la prise en charge.....	28
PARTIE III – LES BIOMARQUEURS URINAIRES DU CANCER DE LA VESSIE.....	30
1. Les marqueurs du cancer de la vessie.....	30
1.1. BTA-TRAK™ et BTA-stat™.....	30
1.2. NMP22.....	31
1.3. ImmunoCyt™.....	31
1.4. BLCA-4.....	32
1.5. FISH.....	32
1.6. MSA.....	32
1.7. Télomérase.....	33
1.8. CYFRA 21-1.....	33
1.9. HA-HAase.....	34
1.10. Survivine.....	34
2. Processus de découverte et d’identification de biomarqueurs.....	38
2.1. Le rôle de la bioinformatique.....	38
2.2. Technologies de protéomique.....	39
3. Evaluation des marqueurs tumoraux.....	42
3.1. Evaluation de l’utilité clinique.....	42
3.2. Evaluation du niveau de preuve.....	44

PARTIE IV – PUCES A PROTEINES MULTIPARAMETRIQUES	46
1. Types de puces à protéines	47
1.1. Pucés à protéines fonctionnelles	47
1.2. Pucés à protéines analytiques.....	47
2. Méthodes de détection	53
2.1. Détection avec marquage	53
2.2. Détection sans marquage	55
3. Applications.....	56
4. Problématiques de validation et de qualité des puces à protéines	61
PARTIE V – TRAVAUX DE RECHERCHE	63
1. Matériels et méthodes	63
1.1. Matériels	63
1.2. Spotting.....	64
1.3. Immunoessai en sandwich	65
2. Résultats	65
2.1. Preuve de concept avec les concentrations d’anticorps non optimisées.....	65
2.2. Vérification de l’activité des anticorps dans un milieu complexe : l’urine.....	67
2.3. Optimisation du test	68
2.4. Réaction croisée	72
2.5. Interactions non-spécifiques.....	72
3. Discussion.....	75
CONCLUSION.....	77
BIBLIOGRAPHIE	79
ANNEXES	87

LISTE DES ABREVIATIONS

BCG : Bacille de Calmette-Guérin
BCIP/NBT : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitrobleu de tétrazolium
BSA : bovine serum albumin
BTA : bladder tumor antigen
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CIS : carcinoma *in situ*
CLAIR : Colorimetric Array Imaging Reader
CYFRA 21-1 : cytokeratin 19 fragment 21-1
DIPROMON : Diagnosis, PROgnosis and MONitoring of drug treatment response in bladder cancer
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
EMBL : European Molecular Biology Laboratory
EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EVCI : espérance de vie corrigée de l'incapacité
FDA : Food and Drug Administration
FISH : fluorescence *in situ* hybridization
HA-HAase : hyaluronic acid and hyaluronidase
HAS : Haute Autorité de Santé
HRP : horseradish peroxydase
hCFHrp : human complement factor H-related protein
IAP : inhibitors of apoptosis
IL : interleukine
INCa : Institut National du Cancer
IPOP : instillation postopératoire précoce
IPR : intellectual property rights
LC : LowCross Buffer
MAQC : Microarray Quality Control Project
MSA : microsatellite analysis
NACB : National Academy of Clinical Biochemistry
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NCCN : National Comprehensive Cancer Network
NCI : National Cancer Institute
NMP22 : nuclear matrix protein 22
PCR : polymerase chain reaction

PBS : phosphate buffered saline
PME : petite et moyenne entreprise
RCA : rolling circle amplification
RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
RTUV : résection transurétrale de la vessie
SAV-PA : streptavidine marquée par la phosphatase alcaline
SELDI : surface-enhanced laser desorption ionization
SM : spectrométrie de masse
SPR : surface plasmon resonance
TDM : tomodensitométrie
TMUGS : Tumor Marker Utility Grading System
TOF : time-of-flight
TRAP : Telomeric Repeat Amplification Protocol
TrEMBL : Translated EMBL Nucleotide Sequence Data Library
TVNIM : tumeur de vessie non infiltrante du muscle
TVIM : tumeur de vessie avec infiltration musculaire

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Diagramme des principales étapes du projet DIPROMON
- Figure 2** : Principe de la technologie HIFI
- Figure 3** : Représentation géographique du taux d'incidence du cancer de la vessie estimé et normalisé selon l'âge, pour 100 000 personnes, tous sexes et âges confondus
- Figure 4** : Taux d'incidence du cancer de la vessie normalisés selon l'âge et classés par sexe et localisation géographique
- Figure 5** : Classification des tumeurs de la vessie
- Figure 6** : Tableaux de risques pour la prédiction de récurrence et de progression chez des patients avec un cancer de la vessie de stade Ta ou T1
- Figure 7** : Procédure d'analyse de profils de protéines dans des échantillons biologiques par la technologie ProteinChip®
- Figure 8** : Stratégies pour la découverte de biomarqueurs utilisant les technologies émergentes
- Figure 9** : Types de puces à protéines
- Figure 10** : *Microarrays* planaires et non planaires
- Figure 11** : Les formats *forward* et *reverse phase* des *microarrays* planaires
- Figure 12** : Stratégies d'immunotests pour la détection de protéines
- Figure 13** : Analyse de protéines par la technologie xMAP® de Luminex
- Figure 14** : Mise au point technique d'une puce à protéines
- Figure 15** : Exemples de deux méthodes de détection avec marquage
- Figure 16** : Immunoessai avec amplification de signal par RCA
- Figure 17** : Principe général de la détection par SPRi
- Figure 18** : Applications des puces à protéines pour la découverte de biomarqueurs et leurs applications en médecine personnalisée
- Figure 19** : Matrice des sondes immobilisées
- Figure 20** : Image d'un puits après immobilisation des sondes (avant l'immunoessai)
- Figure 21** : Preuve de concept
- Figure 22** : Activité des anticorps dans l'urine
- Figure 23** : Comparaisons des courbes d'étalonnage de l'IL6, l'IL10 et l'IL8 avant et après le choix de la concentration optimale d'anticorps de détection
- Figure 24** : Comparaisons des courbes d'étalonnage de l'IL6, l'IL10 et l'IL8 avec une phase d'incubation des interleukines et anticorps de détection de 30 minutes ou 1 heure
- Figure 25** : Comparaisons des courbes d'étalonnage de l'IL6 et l'IL10 avec deux concentrations différentes d'anticorps de capture
- Figure 26** : Réaction croisée
- Figure 27** : Interactions non-spécifiques

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Echancier du projet DIPROMON

Tableau 2 : Classement des cancers par incidence et mortalité, tous sexes confondus, en France en 2012

Tableau 3 : Classification TNM 2010 des tumeurs de la vessie

Tableau 4 : Estimation du risque de récurrence et de progression

Tableau 5 : Surveillance des TVNIM selon les recommandations de la HAS et l'INCa

Tableau 6 : Surveillance des TVIM selon les recommandations de la HAS et l'INCa

Tableau 7 : Prise en charge des TVNIM après RTUV et IPOP selon le risque de récurrence et de progression

Tableau 8 : Caractéristiques de certains marqueurs urinaires du cancer de la vessie

Tableau 9 : Tumor Marker Utility Grading System

Tableau 10 : Niveaux de preuve du TMUGS

Tableau 11 : Niveaux de preuve des études utilisant des tissus archivés

Tableau 12 : Nouvelle version des niveaux de preuve

Tableau 13 : Tests commercialisés basés sur des *microarrays* non planaires

Tableau 14 : Principales caractéristiques des puces à protéines analytiques

Tableau 15 : Tests commercialisés basés sur des puces à ADN ou à protéines avec une application en oncologie

Tableau 16 : Recommandations du NACB pour l'utilisation des puces en oncologie

INTRODUCTION

L'avènement des technologies dites «omiques», comme la génomique et la protéomique, a permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de certaines maladies. Ce sont des techniques à haut-débit qui permettent d'obtenir un grand nombre de données. Elles sont maintenant utilisées dans la recherche biomédicale, notamment pour identifier des cibles moléculaires et des biomarqueurs avec un potentiel thérapeutique ou diagnostique (1).

Elles ont donc une réelle utilité clinique puisque l'information complexe obtenue au niveau moléculaire peut être utilisée au niveau du patient, de façon individuelle. Il faut toutefois qu'un cadre conceptuel et technologique soit créé pour lier ces informations à la prise en charge du patient. Le projet européen DIPROMON (Multimodular biomarker analysis workflow for DIagnosis, PROgnosis and MONitoring of drug treatment response in bladder cancer) a pour objectif de mettre en place un tel cadre pour le cancer de la vessie. Ce cancer a été sélectionné comme un exemple prototypique de la nécessité de développer la personnalisation de la prise en charge des patients.

Dans cette optique, la finalité du projet est d'élaborer un concept de stratification des patients atteints de cancer de la vessie basé sur les profils de biomarqueurs et les données cliniques de chaque patient. Le support se présentera sous la forme d'une plate-forme technologique mesurant les profils de biomarqueurs.

Les travaux présentés ici concernent le développement d'une puce à protéines pour la détection et la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie. Cette puce fera partie de la plate-forme technologique finalisée dans le cadre du projet DIPROMON.

Après une brève présentation du projet, trois parties sont consacrées à la revue bibliographique du cancer de la vessie, des marqueurs urinaires du cancer de la vessie ainsi que des puces à protéines multiparamétriques. Enfin, les travaux de recherche sont présentés dans une dernière partie.

PARTIE I

LE PROJET DIPROMON

Le sujet de recherche s'inscrit dans un projet européen qui a débuté en janvier 2013 et dont la société AXO Science est partenaire. Le projet est intitulé DIPROMON (Multimodular biomarker analysis workflow for **D**iagnosis, **P**ROgnosis and **M**ONitoring of drug treatment response in bladder cancer). C'est un projet approuvé par l'Union Européenne et financé par le 7^{ème} Programme Cadre de Recherche et Développement technologique. AXO Science participe à ce consortium européen en collaboration avec l'Austrian Institute of Technology (Autriche), l'Université de Surrey (Royaume-Uni), Lionex (PME, Allemagne), OnkoTec (PME, Autriche) et Emergentec Biodevelopment (PME, Autriche).

Le projet porte sur le développement du concept de stratification de patients atteints de cancer de la vessie grâce notamment à leurs profils de biomarqueurs et en vue d'applications dans le domaine de la médecine personnalisée. En effet, la stratification permettra d'établir une stratégie thérapeutique ou de suivi, individuelle pour chaque patient.

La médecine personnalisée commence à être intégrée dans la pratique clinique quotidienne grâce aux données maintenant disponibles sur la physiopathologie des maladies mais également grâce aux profils moléculaires des patients. Un exemple bien connu d'utilisation de biomarqueur prédictif pour déterminer les sous-groupes de patients pouvant bénéficier d'un traitement spécifique est le récepteur HER2, surexprimé dans certains cancers du sein. C'est un facteur de mauvais pronostic mais aussi une cible thérapeutique de l'anticorps monoclonal trastuzumab (2).

Cependant il y a eu peu d'autres succès, en particulier dans le domaine de la cancérologie. Ceci est en partie dû à l'hétérogénéité des cancers dans leur présentation clinique et leur réponse aux traitements. Ainsi, DIPROMON vise à surmonter l'état de l'art dans le concept de stratification et de personnalisation en oncologie et plus particulièrement dans le cancer de la vessie.

Pour cela, DIPROMON suit une approche par la biologie des systèmes pour établir des règles statistiques de segmentation des patients, reposant sur des profils de biomarqueurs ainsi que les données cliniques, tous deux spécifiques au patient. La première étape du projet consiste à sélectionner un ensemble de biomarqueurs relatifs au cancer de la vessie. Une plate-forme technologique sera alors développée pour permettre la mesure de ces profils dans un cadre clinique. La plate-forme d'analyse sera ensuite

utilisée pour quantifier le profil de biomarqueurs d'échantillons biologiques de patients atteints de cancer de la vessie. Enfin, elle servira à l'élaboration d'un ensemble de règles de prédiction de l'évolution de la pathologie selon la stratégie thérapeutique. L'ensemble de règles sera validé par une étude clinique. Les principales étapes du projet sont résumées dans la figure ci-dessous.

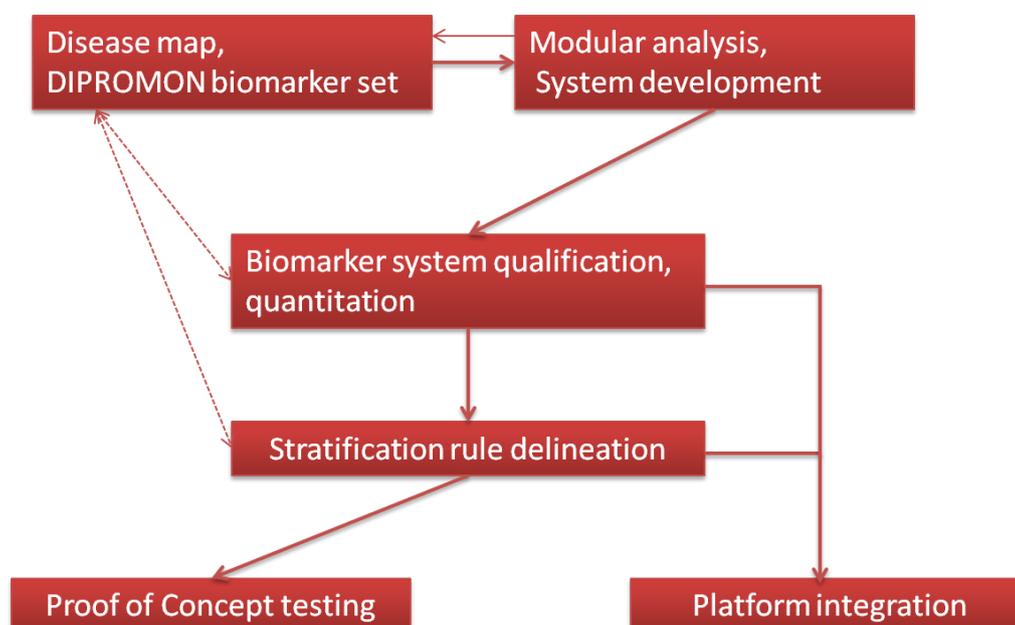


Figure 1 : Diagramme des principales étapes du projet DIPROMON, d'après (3)

En résumé, les principaux objectifs du projet DIPROMON sont :

- d'élaborer un nouveau concept de stratification des patients,
- de construire les outils, technologies et procédures permettant d'appliquer ce concept dans un contexte clinique,
- de valider le concept dans un contexte clinique donné ainsi que dans une étude clinique pilote.

L'association des partenaires offre une valeur interdisciplinaire au projet. En effet, le consortium DIPROMON combine l'expertise du cancer de la vessie en termes de prise en charge (Université de Surrey, en lien avec les centres hospitaliers de Surrey) et de développement d'une nouvelle immunothérapie (Lionex) avec la détection *in vitro* et la caractérisation moléculaire des cellules malignes dans l'urine (OnkoTec), l'identification et la sélection de candidats biomarqueurs (Emergentec Biodevelopment) ainsi que le développement d'outils d'analyse à haut-débit et multiparamétriques dédiés à la caractérisation des systèmes biologiques (Austrian Institute of Technology et AXO Science).

Les travaux présentés dans ce document ont été effectués au sein d'AXO Science. AXO Science est une société de biotechnologie spécialisée dans le diagnostic médical haut-débit. Elle développe des outils d'analyse multiparamétrique de type biopuces dans un environnement robotisé. Pour cela, AXO Science s'appuie sur une innovation technologique, HIFI, qui est basée sur le greffage de sondes sur un matériau adhésif (Figure 2). Cette technologie brevetée permet la mise au point de tests multiparamétriques sous la forme d'une plaque de microtitration de 96, 384 ou 1536 puits adaptée aux chaînes robotisées classiques. En effet, l'immobilisation d'un grand nombre de sondes dans chaque puits donne la possibilité de réaliser un multiplexage important et permet des analyses haut-débit.

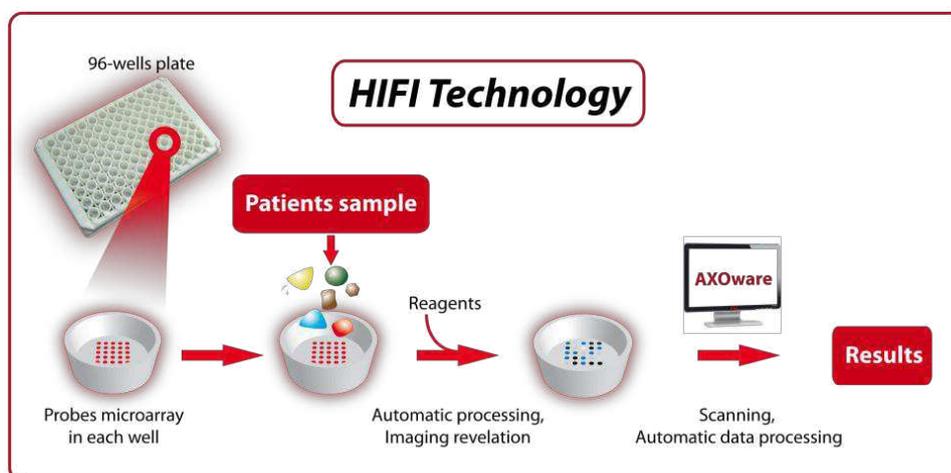


Figure 2 : Principe de la technologie HIFI (4)

Au sein du projet DIPROMON, l'expertise d'AXO Science est utilisée afin de mettre au point un test multiparamétrique haut-débit pour la détection et la quantification des biomarqueurs sélectionnés par les autres partenaires. Le Tableau 1 décrit l'échéancier du projet, organisé sur quatre ans. Toutes les étapes et les tâches concernant AXO Science sont décrites en rouge.

Tableau 1 : Echancier du projet DIPROMON

Tasks	Duration (months)	Year 1				Year 2				Year 3				Year 4			
		Q1	Q2	Q3	Q4												
1. Delineating a disease map and DIPROMON biomarker set	12	■	■	■	■												
2. Modular analysis system development & analytical validation	18	■	■	■	■	■	■										
Microarray analysis system for protein biomarker detection		■	■	■	■	■	■										
Analytical evaluation of the advanced microarray system		■	■	■	■	■	■										
Urine fluorescence cytology		■	■	■	■	■	■										
3. Biomarker testing and biomarker system qualification	24	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Collection of superficial bladder cancer samples		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Biomarker testing & clinical validation of the analysis system						■	■	■	■	■	■	■	■				
Biomarker system qualification						■	■	■	■	■	■	■	■				
4. Rule-based stratification analysis	17							■	■	■	■	■	■				
5. Proof of Concept testing	48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Collection of samples from advanced bladder cancer		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pilot Phase I study										■	■	■	■	■	■	■	■
Biomarker testing for validation of the decision rule										■	■	■	■	■	■	■	■
6. Integration of the patient stratification concept	24									■	■	■	■	■	■	■	■
SOPs (standard operating procedures)										■	■	■	■	■	■	■	■
System integration										■	■	■	■	■	■	■	■
Software development										■	■	■	■	■	■	■	■
7. Project management	48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8. Exploitation, IPR and dissemination	48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

PARTIE II

LE CANCER DE LA VESSIE

1. Epidémiologie

Le cancer de la vessie est le 5^{ème} cancer le plus fréquent en France avec une incidence estimée à près de 12 000 et un nombre de décès proche de 4 780 en 2012 (Tableau 2). Il est diagnostiqué à l'âge moyen de 70 ans (5).

Tableau 2 : Classement des cancers par incidence et mortalité, tous sexes confondus, en France en 2012 (6)

Localisations	Incidence		Mortalité	
	Effectif	Contribution à l'ensemble des cancers	Effectif	Contribution à l'ensemble des cancers
Prostate*	53 465	19,0	8 876	7,5
Sein	48 763	16,3	11 886	10,1
Côlon-rectum	42 152	14,1	17 722	15,0
Poumon	39 495	13,2	29 949	25,3
Vessie	11 965	4,0	4 772	4,0
Pancréas	11 862	3,9	nd	-
Rein	11 573	3,9	3 957	3,3
Lèvre, cavité orale, pharynx	11 316	3,8	3 192	2,7
Mélanome de la peau	11 176	3,7	1 672	1,4
Foie	8 723	2,9	nd	-
Thyroïde	8 211	2,7	375	0,3
Corps de l'utérus	7 275	2,4	2 025	1,7
Estomac	6 556	2,2	4 411	3,7
Système nerveux central	4 999	1,7	3 052	2,6
Ovaire	4 620	1,3	3 150	2,1
Œsophage	4 615	1,5	3 140	2,7
Larynx	3 322	1,1	906	0,8
Col de l'utérus	3 028	1,0	1 102	0,9
Testicule	2 317	0,8	85	0,1
Tous cancers**	355 354	100,0	148 378	100,0

*compte tenu des fluctuations récentes de l'incidence du cancer de la prostate les résultats postérieurs à la dernière année observée par les registres (2009) ne sont pas présentés.

**somme des estimations par localisation en supposant une stabilité des taux d'incidence pour la prostate entre 2009 et 2012 et en ajoutant les estimations pour les hémopathies malignes et la localisation Autres cancers.

Source : Francim / Hospices civils de Lyon / INCa / Inserm / InVs 2013

Traitement : INCa 2013

En 2008, le projet GLOBOCAN, mis en place par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), présenta des données sur l'impact des cancers dans 184 pays ou territoires. Ce projet a permis de fournir des estimations de l'incidence, de la mortalité, de la prévalence ainsi que de l'espérance de vie corrigée de l'incapacité (EVCI) pour les principaux cancers, au niveau national et mondial.

Concernant le cancer de la vessie, les pays d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Afrique du Nord ont montré les taux d'incidence les plus élevés (Figure 3). Les variations d'incidence au niveau mondial s'expliquent en partie par la différence d'exposition aux facteurs de risque du cancer de la vessie. La répartition selon le sexe est également inégale : il y a une majorité masculine de patients atteints par le cancer de la vessie (Figure 4).

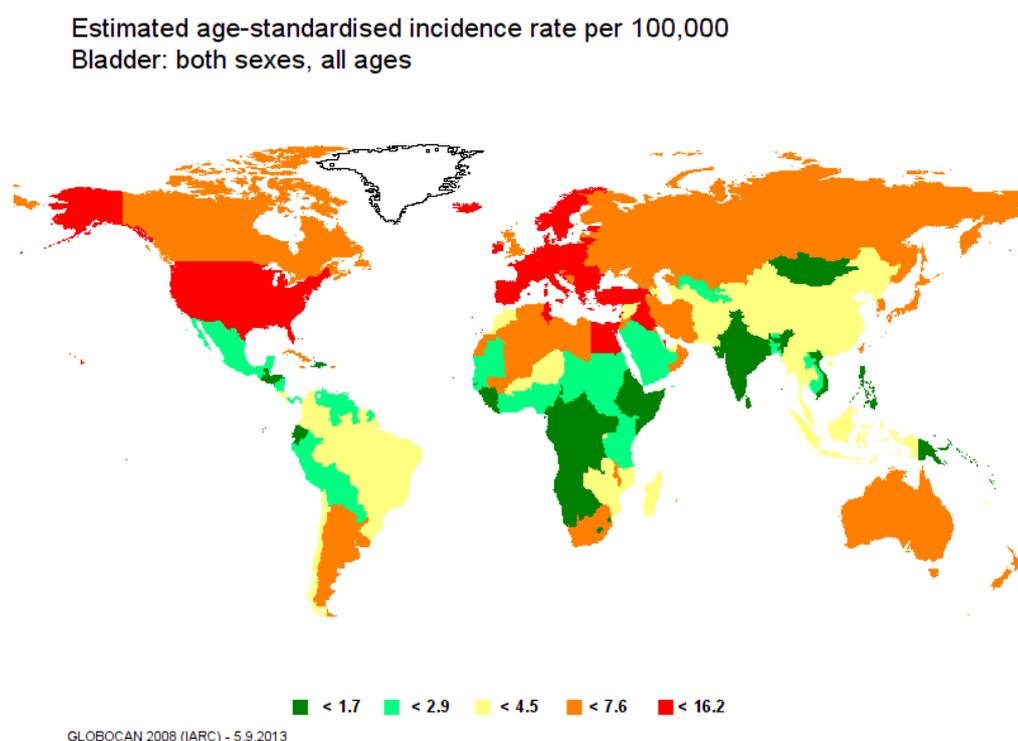


Figure 3 : Représentation géographique du taux d'incidence du cancer de la vessie estimé et normalisé selon l'âge, pour 100 000 personnes, tous sexes et âges confondus (7)

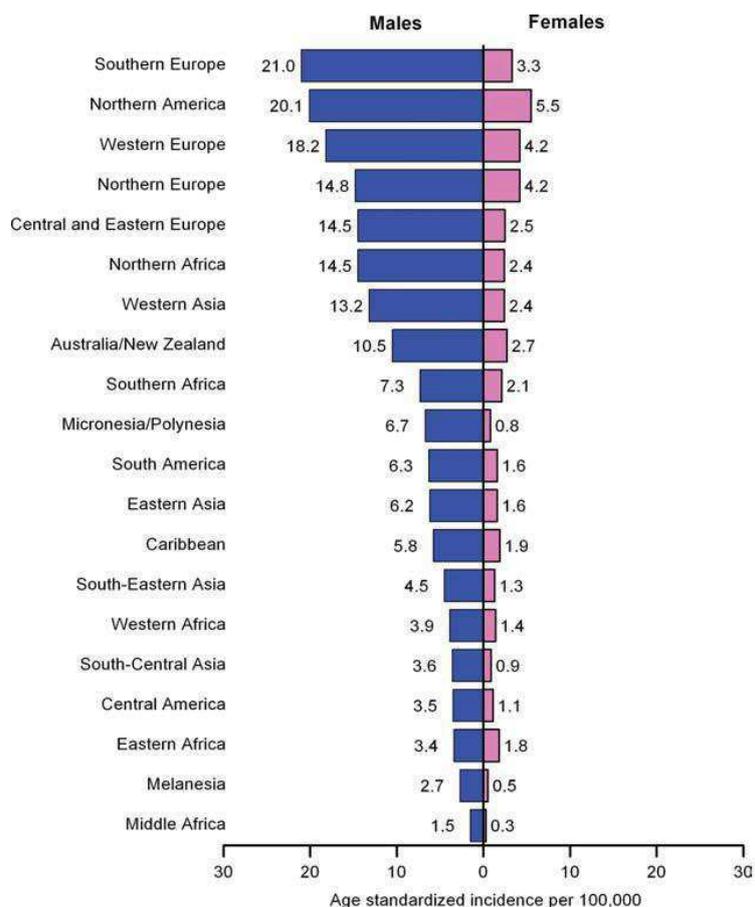


Figure 4 : Taux d'incidence du cancer de la vessie normalisés selon l'âge et classés par sexe et localisation géographique (7,8)

De plus, le type de cancer diffère selon les pays, en lien avec les facteurs de risque prédominants. Ainsi, le tabac et certains carcinogènes chimiques d'origine professionnelle (comme les amines aromatiques) sont les principaux facteurs de risque dans les pays occidentaux et sont associés à des carcinomes à cellules transitionnelles. Le développement d'un carcinome à cellules squameuses est lui associé à la schistosomiase (bilharziose), une infection urinaire chronique par le parasite *Schistosoma haematobium*. C'est donc ce type histologique qui est dominant dans les zones endémiques comme l'Egypte. Ce pays présente un des taux les plus élevés d'incidence du cancer de la vessie avec 23,7 cas pour 100 000 hommes (l'incidence en France est de 7,71 cas pour 100 000 hommes) (7,8).

Il est intéressant de noter que suite à une évolution des facteurs de risque dans certains pays, un changement du type de cancer a été observé. En Egypte, le carcinome à cellules transitionnelles tend à remplacer le carcinome à cellules squameuses comme le type histologique dominant, notamment suite à la diminution de la prévalence de la schistosomiase et l'augmentation du tabagisme. L'urbanisation, l'industrialisation et donc

l'exposition aux carcinogènes chimiques engendrent la même évolution vers le carcinome à cellules transitionnelles dans certains pays en voie de développement (9,10). A l'inverse, le déclin du tabagisme et de l'exposition aux carcinogènes chimiques a permis la diminution à la fois de l'incidence et de la mortalité du cancer de la vessie dans les pays occidentaux (9).

2. Classifications des tumeurs de la vessie

La vessie est un réservoir temporaire de l'urine. C'est un organe creux composé de trois couches :

- La muqueuse : c'est la couche entrant en contact avec l'urine. Elle comprend l'épithélium transitionnel (ou urothélium) et le chorion.
- La musculuse (ou détrusor) : elle est subdivisée en trois couches qui sont la couche interne longitudinale, la couche moyenne circulaire et la couche externe longitudinale.
- L'adventice : c'est la couche la plus externe. Elle contient du tissu conjonctif et forme un matelas adipeux chez l'adulte. Au niveau du dôme de la vessie, l'adventice est recouverte par le péritoine (11).

Selon les NCCN Guidelines (12), le tableau clinique du cancer de la vessie se divise en trois catégories (Figure 5) qui diffèrent dans leurs pronostic, prise en charge et objectif thérapeutique :

- Tumeur de vessie non infiltrante du muscle - TVNIM (superficielle)
- Tumeur de vessie avec infiltration musculaire - TVIM
- Lésions métastatiques

		TVNIM Tumeur non infiltrante			TVIM Tumeur infiltrante			
		Tis	Ta	T1(a-b)	T2	T3a	T3b	T4a-T4b
	Urothélium							
	Chorion							
	Muscle superficiel							
	Muscle profond							
	Tissu adipeux							
Organes de voisinage								

Figure 5 : Classification des tumeurs de la vessie (13)

Les tumeurs vésicales sont classées selon le système TNM qui tient compte du degré d'invasion du cancer en évaluant la tumeur primitive (T), les ganglions (N) et d'éventuelles métastases (M) (Tableau 3).

Les tumeurs peuvent aussi être classées selon leur type histologique. On distingue alors :

- Les carcinomes à cellules transitionnelles (ou urothéliaux) : ils sont de nature épithéliale et correspondent à plus de 90% des tumeurs vésicales. Ils se caractérisent par leur différenciation cellulaire (grade histologique) et leur pénétration dans la paroi vésicale (stade T ou TVNIM/TVIM).
- Les carcinomes à cellules squameuses (ou épidermoïdes) : ils ne représentent que moins de 10% des cancers de la vessie. C'est le type histologique qu'on associe le plus à la schistosomiase (13).

Tableau 3 : Classification TNM 2010 des tumeurs de la vessie (14)

T Tumeur primitive	
Tx	Tumeur primitive non évaluable
T0	Tumeur primitive non retrouvée
Ta	Carcinome papillaire non invasif
Tis	Carcinome <i>in situ</i> « plan »
T1	Tumeur envahissant le chorion
T2	Tumeur envahissant la musculature – <i>T2a</i> : Tumeur envahissant le muscle superficiel (moitié interne) – <i>T2b</i> : Tumeur envahissant le muscle profond (moitié externe)
T3	Tumeur envahissant le tissu péri-vésical – <i>T3a</i> : Envahissement microscopique – <i>T3b</i> : Envahissement extra-vésical macroscopique
T4	Tumeur envahissant une structure péri-vésicale – <i>T4a</i> : Prostate, vagin ou utérus – <i>T4b</i> : Paroi pelvienne ou abdominale
N Ganglions lymphatiques régionaux	
Nx	Ganglions non évaluables
N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastase ganglionnaire unique < 2 cm
N2	Métastase ganglionnaire unique > 2 cm et < 5 cm ou métastases ganglionnaires multiples < 5 cm
N3	Métastase(s) ganglionnaire(s) > 5 cm
M Métastases à distance	
Mx	Métastases non évaluables
M0	Absence de métastase à distance
M1	Métastase(s) à distance

NB : Cette classification ne concerne que les carcinomes urothéliaux.

La fréquence et les taux de survie varient selon le stade de la tumeur : les TVNIM représentent 70 à 80% des cancers de la vessie et ont une survie à 5 ans supérieure à 80% tandis que les TVIM représentent 20 à 30 % des cancers avec une survie à 5 ans inférieure à 50% (5).

Durant l'histoire naturelle de ce cancer, il existe une tendance à la récurrence dans la même partie ou une autre partie de la vessie. Cette récurrence peut être de stade similaire à la tumeur initiale ou de stade plus avancé. Plus précisément, on estime que 50 à 70% des TVNIM récidivent après un traitement de première intention et il y a infiltration du muscle dans 10 à 30 % de ces cas (5). Le risque de récurrence peut être évalué selon le stade de la tumeur (Tableau 4). Ainsi, ces données soulignent l'importance du suivi des patients pour permettre une détection précoce d'une récurrence ou progression.

Tableau 4 : Estimation du risque de récurrence et de progression (5)

Risque faible	Ta unique, bas grade ou LMP* (grades 1 et 2) et diamètre < 3 cm et non récidivée
Risque intermédiaire	- Ta bas grade (grade 1 et 2) ou LMP multifocal et/ou récidivante - T1 de bas grade (grade 1-2)
Risque élevé	- Ta haut grade (grade 3) - T1 haut grade (grade 3) ou T1 récidivante - CIS (carcinome <i>in situ</i>)

*LMP : *Low Malignancy Potential* (tumeur à faible potentiel de malignité)
Les grades histologiques sont décrits dans l'Annexe I.

De plus, il est possible d'estimer la probabilité de récurrence et de progression des patients avec un cancer de stade Ta/T1 grâce aux tableaux de risques et au système de score établis par l'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (Figure 6). Cette probabilité est basée sur six paramètres clinico-pathologiques : le grade, le stade, la taille de la tumeur, le nombre de tumeurs, le taux antérieur de récurrence et la présence de carcinome *in situ* concomitant (15).

Figure 6 : Tableaux de risques pour la prédiction de récurrence et de progression chez des patients avec un cancer de la vessie de stade Ta ou T1 (16)

3. Diagnostic

Dans 80% des cas, le cancer de la vessie est révélé par une hématurie macroscopique, souvent terminale. Des signes d'irritation vésicale comme la pollakiurie, la miction impérieuse ou la brûlure urinaire, sont présents dans 20% des cas (5,14). Suivent alors l'interrogatoire (recherche des facteurs de risque) et l'examen clinique, bien que ce dernier soit le plus souvent normal pour les stades précoces (17).

Devant une suspicion de cancer de la vessie, un bilan diagnostique de référence est réalisé comprenant une échographie de l'appareil urinaire, une cytologie urinaire et une cystoscopie. La confirmation du diagnostic se fait ensuite par l'examen histopathologique à partir d'une résection transurétrale de la vessie (RTUV). L'examen anatomopathologique des copeaux de résection précise le stade et le grade de la tumeur.

La cystoscopie est un examen endoscopique qui fournit des informations sur le nombre, la localisation, l'aspect (papillaire ou solide) et la taille de la tumeur. Elle est systématique devant toute suspicion de cancer de la vessie. La cytologie urinaire est également systématiquement réalisée. Elle se fait sur urines fraîches ou fixées et a pour but de rechercher des cellules tumorales (5,14,18).

La cystoscopie présente une bonne sensibilité (62-84%) mais peut parfois donner de faux-négatifs par erreur de l'opérateur ou par la difficulté à détecter des tumeurs plus

petites comme le carcinome *in situ*. A l'inverse, la cytologie urinaire a une spécificité élevée (78-100%) mais manque de sensibilité (12-84,6%), notamment pour les tumeurs de faible grade (5,19–21). De plus, cet examen nécessite un cytopathologiste qualifié et les résultats peuvent être opérateur-dépendants (19,20).

Par la suite, le bilan d'extension vise à rechercher une multifocalité. En effet, il est possible que des foyers soient également présents dans le haut appareil urinaire qui est aussi composé d'urothélium. L'analyse se fait par un uroscanner (uro-TDM) ou une urographie intraveineuse.

S'il s'agit d'une TVIM, le bilan d'extension se fera alors par la TDM (tomodensitométrie) thoraco-abdomino-pelvienne. Cet examen permet d'évaluer l'atteinte du haut appareil urinaire et des organes voisins ainsi que de détecter d'éventuelles adénopathies et/ou métastases (5).

4. Surveillance

Il existe plusieurs recommandations quant à la fréquence et les types d'examen de suivi des récurrences. Le suivi se fait principalement par cystoscopie et cytologie urinaire, éventuellement associées à un examen par imagerie comme l'uroscanner. La fréquence du suivi diffère selon le type de tumeur (TVNIM ou TVIM) et également selon le risque de récurrence et de progression de la maladie (Tableaux 5 et 6).

Bien que la cystoscopie soit un examen pratiqué en ambulatoire avec le plus souvent une anesthésie locale, il reste un geste invasif (le cystoscope est introduit dans la vessie par le canal de l'urètre). Il est douloureux pour environ un tiers des patients et engendre un risque d'infection urinaire de 10% (22,23).

Tableau 5 : Surveillance des TVNIM selon les recommandations de la HAS et l'INCa (5)

Niveau de risque de récurrence et de progression	Examens
Risque faible	- <i>Cystoscopie</i> : à 3, 6, 12 mois puis annuelle pendant 5 ans (à vie si persistance de l'intoxication tabagique)
Risque intermédiaire	- <i>Cystoscopie</i> : à 3, 6, 12 mois puis annuelle pendant 15 ans (à vie si persistance de l'intoxication tabagique) - <i>Cytologie urinaire</i> : recommandée couplée à la cystoscopie - <i>UroTDM</i> : tous les 2 ans et en cas de cytologie positive ou de symptômes en faveur d'une atteinte du haut appareil
Risque élevé	- <i>Cystoscopie</i> : à 3, 6, 9, 12 mois puis tous les 6 mois la 2 ^{ème} année puis annuelle à vie - <i>Cytologie urinaire</i> : obligatoire couplée à la cystoscopie - <i>UroTDM</i> : tous les 2 ans ou si cytologie positive ou symptômes en faveur d'une atteinte du haut appareil

Tableau 6 : Surveillance des TVIM selon les recommandations de la HAS et l'INCa (5)

Examens	Fréquence	
Examen clinique	A 3 mois après la prise en charge thérapeutique initiale puis tous les 6 mois	
Bilan biologique	- Ionogramme sanguin avec créatinémie - Autres examens selon orientation clinique	Tous les 3 mois pendant un an puis tous les 6 mois les 3 années suivantes puis annuel
TDM thoraco-abdomino-pelvienne	Permet la recherche d'une récurrence locale ou métastatique	A 3 mois après la prise en charge thérapeutique initiale puis tous les 6 mois
Cystoscopie	Si la vessie native a été conservée	Tous les 6 mois pendant les deux premières années puis annuellement à vie
Urétroscopie	Si l'urètre est en place	Annuellement pendant 15 ans

5. Prise en charge thérapeutique

Il existe plusieurs possibilités thérapeutiques selon le tableau clinique du cancer.

5.1. Traitement des TVNIM (Ta, T1 et CIS)

La RTUV est la première étape du traitement des tumeurs non infiltrantes. L'instillation postopératoire précoce (IPOP) de mitomycine C (chimiothérapie) est ensuite recommandée, dans les 6 premières heures et au plus tard dans les 24 heures qui suivent la RTUV (5,14,24).

Ensuite, la prise en charge thérapeutique est discutée en fonction du risque de récurrence et de progression tumorale (Tableau 7).

Tableau 7 : Prise en charge des TVNIM après RTUV et IPOP selon le risque de récurrence et de progression (5,24)

Risque faible	Surveillance simple
Risque intermédiaire	<ul style="list-style-type: none">- Instillations hebdomadaires de mitomycine C sur 8 semaines consécutives après cicatrisation vésicale (4 à 6 semaines). Il n'y a pas d'indication à prolonger les instillations au-delà de ces 8 semaines.- Le BCG peut être discuté comme une alternative aux instillations de mitomycine C ou en cas d'échec du traitement par la mitomycine C.
Risque élevé	<ul style="list-style-type: none">- Instillations endovésicales de BCG (sauf contre-indications) après cicatrisation vésicale (4 à 6 semaines). Si elles sont bien supportées, un traitement d'entretien est recommandé.- En cas d'échec du traitement par BCG, la cystectomie totale est le traitement de choix.- Après la RTUV, une cystectomie d'emblée peut être discutée dans certaines formes à haut risque de progression.

BCG, Bacille de Calmette-Guérin ; IPOP, instillation postopératoire précoce ; RTUV, résection transurétrale de la vessie

5.2. Traitement des TVIM non métastatiques

Le traitement curatif de référence des TVIM non métastatiques est la cystectomie totale avec un curage ganglionnaire pelvien étendu et bilatéral. Chez l'homme, la prostate et les vésicules séminales sont également retirées tandis que chez la femme l'intervention comprend habituellement l'ablation de l'urètre et de l'utérus. Différents types de dérivations urinaires (internes ou externes) sont ensuite possible pour rétablir la continuité urinaire.

Dans certains cas, une chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante est également discutée. Avant la chirurgie, la chimiothérapie permet de réduire le volume tumoral ; elle repose sur un protocole à base de cisplatine. Après la chirurgie, une chimiothérapie peut être discutée s'il existe des facteurs de mauvais pronostic à l'histologie. Enfin, la radiochimiothérapie est parfois considérée comme une alternative à la chirurgie (en cas de contre-indication à la cystectomie ou le refus du patient à la chirurgie) (5,14).

5.3. Traitement des cancers métastatiques

Les tumeurs métastatiques sont traitées par chimiothérapie à base de cisplatine. S'il n'y a pas de contre-indication, le protocole de chimiothérapie M-VAC est utilisé, associant cisplatine, doxorubicine, vinblastine et méthotrexate. Un autre protocole également indiqué est GEMCIS combinant le cisplatine à la gemcitabine (5,25).

La réponse au traitement est évaluée par TDM thoraco-abdomino-pelvienne et une deuxième ligne de traitement peut être envisagée en cas de progression de la tumeur. Si la chimiothérapie permet de stabiliser le cancer, il est possible de considérer une chirurgie ou une irradiation des métastases (5).

6. Besoins d'optimisation de la prise en charge

D'un point de vue économique, le cancer de la vessie présente le coût le plus élevé de prise en charge par patient de tous les cancers. Ce coût, du diagnostic jusqu'au décès, varie selon les pays entre 89 287\$ et 202 203\$ par patient et risque d'augmenter avec l'amélioration des taux de survie (26). Ceci peut être expliqué en partie par le bon pronostic de ce cancer ainsi que le besoin d'une surveillance régulière et à vie dû au risque de récurrence.

Ainsi, l'important fardeau humain, psychologique et économique du cancer de la vessie souligne l'intérêt de l'optimisation des protocoles de diagnostic, et de suivi du patient (26). Parmi les alternatives possibles à la cystoscopie et la cytologie urinaire, les biomarqueurs urinaires ont un fort potentiel pour le diagnostic et la surveillance du cancer de la vessie.

De plus, les biomarqueurs pourraient également être utiles pour guider le clinicien dans le choix thérapeutique. Même si l'agressivité d'un cancer est corrélée avec son stade, il n'existe actuellement pas de moyens de déterminer la probabilité et la durée de réponse à une chimiothérapie. L'utilisation de biomarqueurs pourrait permettre d'identifier les patients les plus susceptibles de répondre de façon favorable à une thérapie donnée.

PARTIE III

LES BIOMARQUEURS URINAIRES DU CANCER DE LA VESSIE

Un biomarqueur (ou marqueur biologique) est défini comme une caractéristique biologique pouvant être moléculaire, anatomique, physiologique ou biochimique. Il peut être mesuré et évalué de façon objective et indique si un processus biologique présente un dysfonctionnement. Il peut également permettre d'évaluer la réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (27).

Différents types de biomarqueurs ont été décrits, selon leur fonction :

- Biomarqueur de diagnostic
- Biomarqueur de risque ou de susceptibilité (de développer une pathologie)
- Biomarqueur pronostique (de l'évolution de la pathologie)
- Biomarqueur prédictif (de la réponse et toxicité d'un traitement)

1. Les marqueurs du cancer de la vessie

De nombreux marqueurs pour la détection et la surveillance du cancer de la vessie ont été identifiés et des tests urinaires ont déjà été développés pour certains de ces marqueurs. Cette partie présentera une liste non-exhaustive de biomarqueurs et leur intérêt dans le cancer de la vessie.

1.1. BTA-TRAK™ et BTA-stat™

BTA-TRAK™ et BTA-stat™ (Polymedco) sont deux dosages dans l'urine du BTA (bladder tumor antigen) qui correspond à la hCFHrp (human complement factor H-related protein). Cette protéine a une fonction similaire au facteur H du complément humain et est libérée par les cellules normales pour les protéger du système immunitaire de leur propre organisme. Dans les cellules cancéreuses, le BTA permet donc l'échappement au système immunitaire (28,29).

Le test BTA-TRAK™ correspond à un dosage quantitatif par une méthode immuno-enzymatique de type sandwich, utilisant deux anticorps monoclonaux (30) tandis que le BTA-stat™ est un dosage qualitatif par immunochromatographie. Les deux tests ont montré une sensibilité plus importante que la cytologie urinaire mais une spécificité plus basse du fait de faux-positifs possibles lors notamment de pathologies génito-urinaires non tumorales (20,29). Ces tests ont été approuvés par la US FDA uniquement pour le

suiwi du cancer de la vessie en association avec la cystoscopie. Ils ne peuvent être utilisés pour le dépistage ou le diagnostic en raison de leur faible spécificité (19).

1.2. NMP22

NMP22 (nuclear matrix protein 22) fait partie de la structure du noyau et est un important régulateur de la mitose. Les cellules cancéreuses possèdent une concentration significativement plus élevée de NMP22. Cette dernière est libérée dans l'urine lors de l'apoptose des cellules.

Il existe deux tests commercialisés par Alere : Alere NMP22® Test (test ELISA quantitatif) et Alere NMP22 BladderChek® (test immunochromatographique). Ils sont tous les deux approuvés par la FDA dans le cadre du suivi du cancer de la vessie. Le test Alere NMP22 BladderChek® peut également être utilisé pour la détection du cancer chez les patients à haut-risque (19).

Comme le BTA et d'autres marqueurs urinaires, la sensibilité du NMP22 est meilleure que celle de la cytologie urinaire mais la spécificité reste inférieure à celle de la cytologie car la NMP22 n'est pas spécifique aux cellules tumorales et peut être augmentée dans d'autres pathologies. De plus, il n'existe pas encore de valeur seuil de positivité établie. Elle varie selon les études, ce qui peut faire augmenter ou diminuer la spécificité (19,22,29).

1.3. ImmunoCyt™

ImmunoCyt™ est un test commercialisé par Scimedx. Il est basé sur une technique d'immunocytofluorescence et utilise trois anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes exprimés préférentiellement par les cellules tumorales vésicales. C'est un test visant à améliorer la sensibilité de la cytologie urinaire. Les cellules collectées dans l'urine du patient sont fixées sur une lame puis la lecture des résultats se fait grâce à un microscope à fluorescence. Cela nécessite donc un personnel qualifié et une variabilité inter-opérateur est possible.

Une fois de plus, la sensibilité est supérieure à celle de la cytologie urinaire tandis que la spécificité reste inférieure. ImmunoCyt™ est uniquement approuvé pour être utilisé en association à la cytologie dans un contexte de suivi du cancer de la vessie. La sensibilité globale d'ImmunoCyt™ avec la cytologie est supérieure à celle de la cytologie seule. Cependant, la spécificité globale est inférieure à celle de la cytologie seule (20,29,31).

1.4. BLCA-4

Une protéine de la matrice nucléaire (NMP) spécifique au cancer de la vessie a été identifiée et nommée BLCA-4. Elle est présente à la fois dans la tumeur et dans les zones adjacentes mais n'est pas détectée dans les vessies exemptes de tumeur (32).

La concentration urinaire de BLCA-4 est mesurée par un test ELISA de type sandwich. Des études sur des échantillons urinaires de patients atteints de cancer de la vessie ont déterminé une sensibilité du test entre 89% et 96,4% ainsi qu'une spécificité entre 95% et 100 % (32,33). Ce marqueur possède donc à la fois une haute sensibilité et une haute spécificité mais une étude à plus grande échelle serait nécessaire pour confirmer cette observation.

1.5. FISH

Certains chromosomes des cellules vésicales tumorales possèdent des altérations. Ces anomalies génétiques sont mises en évidence dans les cellules exfoliées dans l'urine par la technique FISH (fluorescence *in situ* hybridization). Il existe un kit commercialisé par Abbott : UroVysion™. Ce kit contient des sondes d'ADN qui détectent l'aneuploïdie dans les chromosomes 3, 7 et 17 ainsi que la perte du locus 9p21.

Dans la plupart des études comparatives, la technique FISH montre une sensibilité supérieure à celle de la cytologie. De plus, la sensibilité augmente lorsque les stades de tumeurs sont avancés. Sa spécificité est similaire à celle de la cytologie. En effet, la technique FISH recherche des anomalies au niveau nucléaire et n'est pas affectée par d'autres pathologies non tumorales (19,22,29).

Le test UroVysion™ est approuvé par la FDA pour le suivi des patients atteints de cancer de la vessie. Du fait de sa spécificité élevée, il est également approuvé pour la détection de cancer chez les patients présentant une hématurie (20).

1.6. MSA

Les microsatellites sont des répétitions de séquences courtes d'ADN (1 à 4 nucléotides) réparties sur l'ensemble du génome. Ils peuvent subir des altérations pouvant être utilisées comme marqueur de développement tumoral. Ces mutations peuvent engendrer une perte d'hétérozygotie suite à un changement dans le ratio normal de deux allèles d'un gène. Le chromosome 9 est le chromosome le plus souvent impliqué dans la perte d'hétérozygotie dans le cadre du cancer de la vessie (19). Les mutations peuvent également être la cause d'une instabilité des microsatellites.

Dans une étude prospective, l'analyse des marqueurs de microsatellites (*microsatellite analysis*, MSA) dans l'urine a montré une sensibilité supérieure à la cytologie urinaire pour

les tumeurs de grades 1 et 2. Elle est en effet intéressante pour l'amélioration de la détection des tumeurs de faible grade : une sensibilité de 75 à 95% a été décrite pour les tumeurs de grades G1-G2 et de 75 à 100% pour les tumeurs pTis et pTa (34,35).

La technique d'analyse de microsatellites présente également une spécificité élevée (29). Il n'a pas encore été établi une corrélation entre la perte d'hétérozygotie et le pronostic des tumeurs (29).

1.7. Télomérase

Les télomères sont des séquences répétées d'ADN situées aux extrémités des chromosomes. Il y a une perte de ces séquences à chaque division cellulaire provoquant une instabilité des chromosomes et régulant la sénescence cellulaire. La télomérase est une enzyme (ribonucléoprotéine) qui régénère des télomères à la fin de la réplication de l'ADN. Cela permet de maintenir la stabilité des chromosomes et donc de rendre la cellule immortelle. La télomérase se trouve dans les cellules germinales et dans la majorité des cellules cancéreuses mais les cellules somatiques normales n'en possèdent pas (29,31).

Concernant le cancer de la vessie, une activité télomérasique a été démontrée dans les cellules exfoliées dans l'urine (36). La détection se fait par une méthode de PCR appelée TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol). Cette technique doit être effectuée dans un laboratoire spécialisé (31,37).

Une revue systématique des études sur certains marqueurs du cancer de la vessie (38) a montré la supériorité de l'analyse de l'activité télomérasique en termes de sensibilité (75%) par rapport aux autres marqueurs (dont BTA et NMP22) et à la cytologie urinaire.

1.8. CYFRA 21-1

Les cytokératines constituent les protéines des filaments intermédiaires spécifiques aux cellules épithéliales. Vingt isotopes de cytokératines différents ont été identifiés chez l'homme. Les fragments de cytokératines sont solubles dans le sérum et l'urine et peuvent donc être détectés. Parmi ces fragments, CYFRA 21-1 (fragment soluble de la cytokératine 19) est détecté dans plusieurs types de cancer. Le dosage quantitatif se fait par une technique ELISA d'électrochimiluminescence utilisant deux anticorps monoclonaux (22,29).

Dans le cadre du cancer de la vessie, les performances de ce test varient de 43 à 79,3% pour la sensibilité et de 68 à 84% pour la spécificité, selon les études et la valeur seuil choisie. Une étude prospective a été menée sur 446 patients atteints de cancer de la vessie de grade Ta ou T1 et sous surveillance à la suite d'une RTUV. L'objectif était d'établir une valeur limite pour le dosage de CYFRA 21-1 lors de la détection de récidives.

Les auteurs ont conclu que CYFRA 21-1 n'était pas un bon marqueur urinaire du suivi des TVNIM car aucune valeur limite n'a permis d'obtenir une sensibilité et une spécificité acceptables (39).

1.9. HA-HAase

L'acide hyaluronique (HA) est un glycosaminoglycane retrouvé dans les tissus et les fluides humains normaux. Il aide l'adhésion des cellules tumorales et leur migration. L'acide hyaluronique est dégradé en fragments par l'enzyme hyaluronidase (HA-ase). Les deux sont associés à l'angiogenèse des tumeurs de la vessie et sont sécrétés dans l'urine. De plus, l'augmentation des niveaux de hyaluronidase est corrélée au grade de la tumeur. Le test HA-HAase est un dosage quantitatif de ces deux marqueurs, utilisant une technique d'ELISA-like (22,29).

Le test de l'acide hyaluronique seul a une sensibilité de 83,1% et une spécificité de 90,1% et celui de la hyaluronidase donne une sensibilité de 81,5% et une spécificité de 83,8% pour les tumeurs de haut grade. Une étude a montré que l'utilisation des deux tests ensemble améliorait les résultats quel que soit le grade de la tumeur : la sensibilité des tests combinés est de 91,2% et la spécificité de 84,4% (35,40).

Dans une autre étude, il a été montré que HYAL1 était le type de hyaluronidase lié au cancer de la vessie. Les résultats de l'étude suggèrent que HYAL1 joue un rôle dans le potentiel invasif des cellules tumorales. Ces observations peuvent donc expliquer pourquoi les niveaux urinaires de hyaluronidase servent de marqueur précis pour la détection des tumeurs de haut grade tandis que ces niveaux ne sont pas élevés pour les tumeurs de bas grade. L'étude a également montré que le blocage de l'expression de HYAL1 réduit la croissance tumorale et l'invasion (41).

Ainsi, le test HA-HAase est très prometteur car il a une sensibilité élevée à la fois pour détecter les tumeurs de faible grade et de haut grade. Il mérite donc des études plus poussées.

1.10. Survivine

La survivine fait partie de la famille des protéines régulant la mort cellulaire, les IAP (inhibitors of apoptosis). Elle inhibe les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose en empêchant l'activation de certaines caspases (22,29,31). Elle est exprimée lors du développement fœtal mais n'est pas retrouvée dans les tissus adultes normaux.

Dans le cancer de la vessie, la survivine est détectée dans l'urine et est associée au stade de la tumeur, la progression, la récurrence et la mortalité (42). Le dosage quantitatif de l'expression de la survivine se fait par RT-PCR (expression de l'ARN messager). Une étude a montré que ce dosage avait une grande sensibilité (94%) ainsi qu'une grande

spécificité (95%) chez les patients atteints de TVNIM (43). Une autre étude, utilisant un autre système de détection (Western Blot), a montré que des niveaux urinaires élevés de survivine étaient associés à un plus haut risque de cancer de la vessie avec une tumeur de plus haut grade. Les auteurs ont trouvé une sensibilité (64%) et une spécificité (93%) supérieures à celles du NMP22 et de la cytologie urinaire (44).

La survivine se présente donc comme un bon marqueur pour le diagnostic et la surveillance des cancers de la vessie mais d'autres études sont encore nécessaires (22,31).

Les caractéristiques des biomarqueurs cités ci-dessus sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques de certains marqueurs urinaires du cancer de la vessie (31)

Marqueur/Test	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Avantages	Inconvénients
BTA-TRAK™	24-89	52-93		Influencé par les affections génito-urinaires bénignes
BTA-stat™	57-79	48-95		Influencé par les affections génito-urinaires bénignes
NMP22	49,5-65	40-87,3	Insensible au traitement par BCG et détection des tumeurs de bas grade	Pas de valeur seuil clairement définie
ImmunoCyt™	38,5-100	73-84,2		Forte variabilité inter-observateur
BLCA-4	89-96,4	95-100	Sensibilité et spécificité	Nécessité d'études plus poussées
FISH	69-87	89-96	Insensible au traitement par BCG	Besoin d'opérateurs qualifiés et coûteux
MSA	72-97	80-100	Détection des tumeurs de bas grade	Complexe et coûteux
Téломérase	70-100	60-70	Sensibilité	Influencé par l'inflammation et l'âge
CYFRA 21-1	43-79,3	68-84		Influencé par les affections génito-urinaires bénignes et instillations
HA-HAase	83-94	77-93,4	Détection des tumeurs de bas grade	Nécessité d'études plus poussées
Survivine	64-84	93-100	Sensibilité et spécificité	Nécessité d'études plus poussées

BTA, bladder tumour antigen; NMP22, nuclear matrix protein; BCG, Bacille de Calmette-Guérin; FISH, fluorescence *in situ* hybridization ; MSA, microsatellite analysis ; CYFRA 21-1, cytokeratin 19 fragment; HA-HA-ase, hyaluronic acid and hyaluronidase.

Il existe de nombreux autres marqueurs urinaires du cancer de la vessie dont une partie est encore à l'étude. De façon générale, les marqueurs actuellement étudiés et présentés ci-dessus ont une sensibilité augmentée en comparaison à la cytologie urinaire mais manquent souvent de spécificité. Actuellement, il n'y a aucun marqueur suffisamment puissant pour remplacer la cytologie urinaire et la cystoscopie qui restent les « gold standards » à la fois pour le diagnostic et le suivi du cancer de la vessie. L'utilisation de biomarqueurs pourrait néanmoins allonger l'intervalle entre ces examens de suivi et ainsi potentiellement diminuer le coût de la prise en charge ainsi que la gêne du patient (la surveillance par cystoscopie et cytologie urinaire peut être à vie chez certains patients) (20,45).

L'intérêt à la fois diagnostique et pronostique est souvent étudié pour les nouveaux marqueurs urinaires. Il est cependant important de faire la distinction entre l'utilité d'un marqueur dans le cadre du diagnostic d'une tumeur de la vessie et celle d'un marqueur pour la surveillance d'une récurrence. Pour diagnostiquer une tumeur (par exemple lors d'un dépistage de patients à haut risque), la sensibilité du marqueur doit être élevée quelque soit le stade de la tumeur. Dans ce contexte, on privilégie une bonne sensibilité au détriment de la spécificité.

A l'inverse, dans le cadre d'un suivi de patient atteint de cancer de la vessie, l'importance est plus portée sur les stades tumoraux de haut grade. En effet, si la récurrence concerne une tumeur de bas grade, la détection plus tardive est moins susceptible d'impacter le pronostic du patient. Avec sa grande sensibilité pour les tumeurs de haut grade, le marqueur permettra cependant de diminuer la fréquence des examens de suivi (grâce à sa haute valeur prédictive négative) (20).

Bien que le marqueur idéal n'existe pas, il est envisageable d'utiliser un ensemble de marqueurs donnant de meilleures caractéristiques diagnostiques ou pronostiques comparativement à une analyse individuelle de ces biomarqueurs.

Quant à l'utilisation de marqueurs dans le cadre de décisions thérapeutiques, il n'existe pas encore de protocoles définissant la stratégie thérapeutique selon l'analyse de marqueurs. Mais la médecine personnalisée est une notion qui progresse rapidement, notamment en lien avec l'utilisation de biomarqueurs (46,47). Elle prend en compte le fait que les patients n'ont pas tous une réponse identique au même traitement et ne présentent pas tous non plus le même risque de récurrence.

Plus précisément, la médecine personnalisée est définie par le NCI (National Cancer Institute, USA) comme « une forme de médecine qui utilise des informations sur les gènes, les protéines et l'environnement du patient pour prévenir, diagnostiquer et traiter la

maladie ». Dans le domaine de la cancérologie, il existe de nombreuses applications de la médecine personnalisée comme le dépistage, le diagnostic, le pronostic, la prédiction de l'efficacité d'un traitement, le suivi des patients pour la détection de récurrence et la stratification des patients pour l'individualisation du traitement (48).

Un des objectifs du projet DIPROMON est de mettre en place des règles de stratification des patients grâce à leurs données cliniques et leurs profils de biomarqueurs. Dans le cadre de la médecine personnalisée, la stratification correspond à l'identification de groupes de patients avec des caractéristiques communes au niveau biologique et sert à sélectionner, pour chacun de ces groupes, la prise en charge optimale. Le traitement et le suivi seront alors adaptés individuellement à chaque patient en fonction de l'agressivité du cancer et de la probabilité de réponse à un certain traitement (27,48).

2. Processus de découverte et d'identification de biomarqueurs

Le développement de la médecine personnalisée a créé une forte demande de biomarqueurs pouvant être utilisés à la fois dans le cadre du diagnostic et celui de la stratification des patients. En parallèle, la quête de nouveaux biomarqueurs a été relancée par l'émergence de techniques protéomiques et d'approches systémiques pour étudier la physiopathologie de maladies comme le cancer (49).

Le terme « protéome » se réfère à l'ensemble des protéines produites par un organisme ou un système cellulaire. La protéomique concerne donc l'étude à grande échelle d'un protéome et de la signification biologique des protéines. Ainsi, les études protéomiques peuvent avoir différents objectifs comme comprendre tous les aspects des protéines (leur expression, fonction, interaction et structure) et mener à la découverte de nouveaux marqueurs biologiques d'états pathologiques (50).

Il existe deux principaux défis liés à la protéomique et l'étude de l'ensemble des protéines d'une cellule (cancéreuse par exemple). Le premier est le besoin de nouvelles technologies pour pouvoir analyser simultanément de nombreux échantillons et protéines. Le deuxième est le développement d'outils de bioinformatique pour gérer et analyser les grandes quantités de données obtenues (50).

2.1. Le rôle de la bioinformatique

Les deux rôles principaux de la bioinformatique dans le processus de découverte de nouveaux biomarqueurs sont la gestion de données et l'exploration de données (*data mining*). La gestion de données se fait principalement par des bases de données qui permettent de stocker, rechercher et récupérer un certain nombre d'informations. Il existe de nombreuses bases de données disponibles dont les principales sont SWISS-PROT,

TrEMBL et NCBI. Quant à l'exploration de données, elle concerne l'analyse et l'interprétation des données générées par les technologies de protéomiques. Pour cela, des outils d'interprétation de données, de reconnaissance de motifs et d'analyses prédictives sont utilisés (50).

2.2. Technologies de protéomique

La spectrométrie de masse (SM) et les puces à protéines sont les deux technologies principalement utilisées pour analyser des échantillons cliniques pour la recherche de marqueurs biologiques. La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet de détecter et d'identifier des molécules selon leur masse. La source d'ionisation convertit les molécules en ions puis l'analyseur mesure le rapport masse/charge (m/z) des ions. Parmi les différentes techniques de SM, la méthode d'ionisation SELDI (surface-enhanced laser desorption ionization) est apparue comme un bon moyen de découvrir les signatures ioniques de potentiels biomarqueurs, même si leur identité est inconnue (50,51).

Un exemple d'outil dérivé de cette méthode est la SELDI ProteinChip® (Bio-Rad). La technologie ProteinChip® Array est utilisée pour la découverte, la validation, l'identification et la caractérisation de protéines à partir d'échantillons biologiques. Elle associe la technique SELDI-TOF-MS (surface enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) à un format de puce (Figure 7). En effet, les échantillons biologiques sont déposés sur la puce dont les propriétés de surface permettent de retenir les protéines. Ces protéines sont ensuite analysées et détectées par SELDI-TOF-MS à l'aide d'un lecteur ProteinChip®. Les profils ainsi obtenus des différentes séries d'échantillons sont ensuite comparés grâce à une technique appelée cartographie de l'expression différentielle des protéines : les niveaux relatifs d'expression de protéines à un poids moléculaire spécifique sont comparés par des méthodes statistiques et des logiciels de bioinformatique (52). Une étude a également montré le potentiel de la technologie ProteinChip® Array en tant qu'outil de diagnostic des tumeurs de la vessie à cellules transitionnelles. Les auteurs ont conclu que la détection des changements au niveau protéique grâce à cette technologie augmente la sensibilité du diagnostic et qu'il est donc possible d'améliorer le diagnostic du carcinome à cellules transitionnelles par cette méthode. Des études plus approfondies sont maintenant nécessaires pour établir son utilité (53).

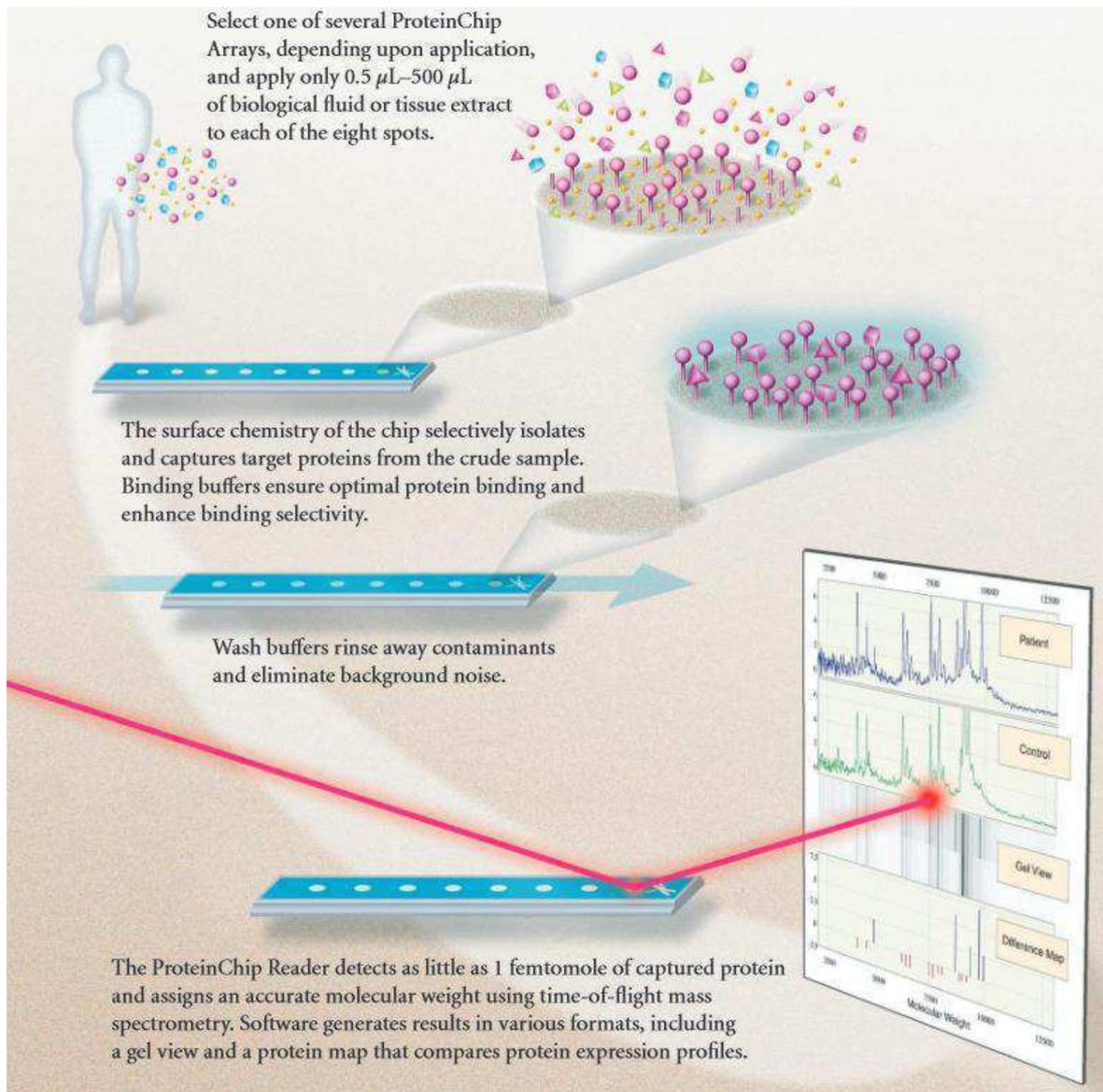


Figure 7 : Procédure d'analyse de profils de protéines dans des échantillons biologiques par la technologie ProteinChip®, d'après (52)

Tout comme la SM, les puces à protéines peuvent aider à l'identification d'un marqueur, d'un groupe de marqueurs ou d'un profil de protéome, selon le type de puce. Elles permettent de détecter et quantifier des candidats de façon massive et parallèle. Les méthodes d'identification de nouveaux marqueurs biologiques peuvent être divisées en trois catégories (54) :

- L'approche guidée par les données : c'est une analyse du protéome entier permettant d'identifier un lien entre les protéines quantifiées et un état pathologique particulier. C'est une approche non biaisée car aucune supposition n'est faite sur les protéines qui pourraient être impliquées.

- L'approche basée sur la connaissance : c'est une approche protéomique ciblée selon laquelle les biomarqueurs potentiels sont déterminés grâce à l'état des connaissances scientifiques pour une pathologie. La dépendance de l'état des connaissances peut être un inconvénient car si ce dernier n'est pas assez développé, certains marqueurs non connus ne pourront être identifiés.
- L'approche basée sur la biologie des systèmes : la biologie des systèmes est un domaine de recherche interdisciplinaire qui étudie le comportement et les relations de tous les éléments d'un système biologique et qui développe des modèles de prédiction de son comportement (55). Cette approche s'oppose à l'approche dite réductionniste qui analyse un système complexe en le divisant en plusieurs parties et en déterminant les rapports entre celles-ci. Cela suppose que l'étude des molécules isolées suffit pour comprendre l'ensemble du système (56) alors que la biologie des systèmes est basée sur l'intégration de grandes quantités de données génomiques et protéomiques associées à des techniques de calcul (méthodes computationnelles) (54).

Les puces à protéines sont décrites de façon plus approfondie dans une partie dédiée à ces outils (Partie IV).

La figure 8 résume les stratégies possibles pour découvrir de nouveaux biomarqueurs. Cela inclut l'utilisation de technologies émergentes comme la protéomique, la SM et les puces à protéines. Certaines stratégies reposent également sur l'étude des mécanismes d'élévation des biomarqueurs dans les échantillons biologiques. En cancérologie, les mécanismes principaux sont la surexpression de gènes codant pour des protéines, l'augmentation de la sécrétion et de l'excrétion de protéines ainsi que l'angiogenèse, l'invasion et la destruction de l'architecture tissulaire (qui peut permettre une libération de molécules) (57).

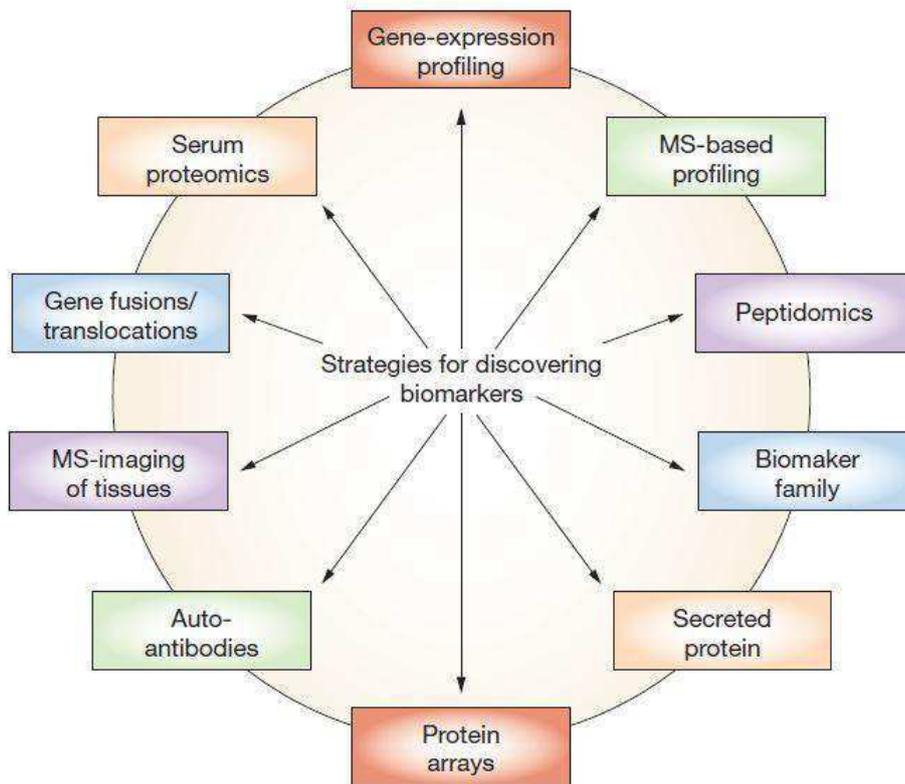


Figure 8 : Stratégies pour la découverte de biomarqueurs utilisant les technologies émergentes, d'après (57). MS, mass spectrometry

Une fois que des marqueurs potentiels sont identifiés, ceux-ci doivent être évalués et une validation clinique est nécessaire.

3. Evaluation des marqueurs tumoraux

Un obstacle important au progrès dans le développement de nouveaux biomarqueurs en cancérologie est l'absence de validation à grande échelle des marqueurs (58). Un système d'évaluation des marqueurs tumoraux a été développé à partir de 1996 : le Tumor Marker Utility Grading System (TMUGS). Ce système offre un cadre pour évaluer l'utilité clinique des marqueurs tumoraux. Il repose sur deux principes qui sont le concept d'utilité et le degré d'évidence (niveau de preuve) (59).

3.1. Evaluation de l'utilité clinique

Concernant l'utilité, chaque marqueur obtient un score semi-quantitatif selon les preuves qui le corrént avec le processus biologique et le critère évalué (Tableau 9). Un score de « 0 » signifie que le marqueur n'a aucune utilité pour l'utilisation définie. Le score « ± » est attribué aux marqueurs pour lesquels seules des données préliminaires sont

disponibles pour appuyer leur utilisation clinique. Le plus haut niveau est « +++ » et correspond aux marqueurs pouvant être utilisés de façon indépendante pour prendre des décisions cliniques. Le score « ++ » lui correspond aux marqueurs avec une utilité clinique seulement dans le contexte d'autres données. Enfin, « + » indique que des études supplémentaires doivent être faites pour confirmer l'utilité clinique du marqueur (60).

Tableau 9 : Tumor Marker Utility Grading System, d'après (60)

Score d'utilité	Description
0	Le marqueur a été évalué pour une utilisation spécifique et les données démontrent définitivement qu'il n'a aucune utilité. Il ne doit pas être utilisé dans un contexte clinique.
NA	Aucune donnée n'est disponible sur le marqueur pour cette utilisation car il n'a pas été étudié dans un contexte clinique pour cette utilisation.
±	Les données suggèrent que le marqueur peut être corrélé avec le processus biologique et les données préliminaires suggèrent que l'utilisation du marqueur peut contribuer à l'évolution clinique favorable. Cependant, des études plus concluantes sont nécessaires. Ainsi, le marqueur est toujours considéré comme hautement expérimental et ne doit pas être utilisé en pratique clinique.
+	Les données disponibles sont suffisantes pour démontrer que le marqueur est en corrélation avec le processus biologique et / ou le critère lié à l'utilisation, et que les résultats du marqueur pourraient affecter le résultat clinique de façon favorable pour cette utilisation. Cependant, le marqueur est toujours considéré comme expérimental et ne doit pas être utilisé en pratique clinique, pour l'une des trois raisons suivantes : 1) le marqueur est en corrélation avec un autre marqueur ou un test pour lequel on a établi une utilité clinique, mais le nouveau marqueur n'a pas clairement montré un avantage, 2) le marqueur peut contribuer des informations indépendantes, mais il est difficile de savoir si ces informations ont une utilité clinique parce que les différentes options de traitement n'ont pas démontrées leur influence sur un changement dans la progression de la maladie, 3) les données préliminaires sur le marqueur sont assez encourageantes, mais le niveau de preuve de l'utilité clinique n'est pas suffisant.

++	Le marqueur fournit des informations (non disponibles à partir d'autres mesures) qui sont utiles pour le clinicien dans la prise de décision pour cette utilisation, mais le marqueur ne peut pas être utilisé comme seul critère de décision. Ainsi, le marqueur a une utilité clinique pour cet usage, et il devrait être considéré comme une pratique courante dans <i>certaines</i> situations.
+++	Le marqueur peut être utilisé comme un critère indépendant pour la prise de décision pour cette utilisation. Ainsi, le marqueur a une utilité clinique pour cet usage, et il devrait être considéré comme une pratique <i>standard</i> .

3.2. Evaluation du niveau de preuve

Plusieurs types d'études cliniques permettant d'évaluer cette utilité ont été décrits (61,62). L'évaluation définitive de l'utilité clinique de biomarqueurs nécessite la conduite d'essais cliniques randomisés (répartition aléatoire des sujets dans les différents groupes de l'étude). Les auteurs du TMUGS ont également développé une classification des niveaux d'évidence, définissant la qualité des données qui existent et sur lesquels le score d'utilité est fondé (Tableau 10). Une échelle de niveaux de preuve a également été proposée pour la conception d'études de biomarqueurs utilisant des tissus archivés (Tableau 11).

Idéalement, l'utilité clinique d'un marqueur devrait être déterminée dans un essai clinique randomisé et prospectif. Toutefois, ce type d'essais n'est pas toujours réalisable. Pour les marqueurs tumoraux, il peut être difficile de mettre en place de tels essais cliniques car ils peuvent impliquer la non administration de traitement chez un groupe de patients et donc être contraire aux recommandations de pratique clinique en oncologie. Même lorsque ces essais sont considérés comme éthiques, ils sont limités par leur coût et leur durée (une étude peut prendre plusieurs années).

Ainsi, l'utilisation de banques de tissus archivés provenant d'essais thérapeutiques randomisés peuvent être d'une grande importance pour établir l'utilité pronostique ou prédictive d'un biomarqueur (63,64). Une analyse robuste des échantillons archivés permet, dans certains cas, de fournir de solides données de validation. Par exemple, les mutations du gène KRAS ont été étudiées sur des échantillons de tumeurs de patients atteints de cancer colorectal. Ces études ont démontré l'association entre les mutations et la résistance aux thérapies ciblées des anticorps anti-EGFR tels que le cetuximab et le panitumumab (65,66).

Tableau 10 : Niveaux de preuve du TMUGS (59,63)

Niveau	Type d'étude
I	Prospective avec le marqueur comme objectif premier Bonne puissance ou méta-analyse
II	Prospective avec le marqueur comme objectif second
III	Rétrospective, analyse multivariée, résultats positifs
IV	Rétrospective, analyse univariée, résultats positifs
V	Rétrospective, corrélation avec autre marqueur, pas de résultats

Tableau 11 : Niveaux de preuve des études utilisant des tissus archivés (63,64)

Niveau	Type d'étude
A	Prospective et contrôlée, visant l'évaluation du marqueur
B	Prospective, utilisant des échantillons archivés, dont le but premier n'est pas d'évaluer le marqueur
C	Prospective/observationnelle, traitement et suivi standards
D	Sans aspect prospectif

Le système de niveaux de preuve TMUGS a été révisé par ses auteurs pour inclure la classification des essais cliniques utilisant des tissus archivés. Ce nouveau système peut ainsi être utilisé pour classer les marqueurs tumoraux mais suggère aussi quelles études de validation sont nécessaires pour chaque niveau (Tableau 12).

Tableau 12 : Nouvelle version des niveaux de preuve (63,64)

Niveau de preuve	Catégorie du Tableau 11	Etudes de validation
I	A	Pas nécessaire mais souhaitable si possible
I	B	Une ou plus avec des résultats cohérents
II	B	Aucune, ou résultats incohérents
II	C	Deux ou plus avec des résultats cohérents
III	C	Aucune ou une avec des résultats cohérents ou des résultats incohérents
IV-V	D	NA*

*Ce type d'étude ne permet pas d'évaluer l'utilité clinique

PARTIE IV

PUCES A PROTEINES MULTIPARAMETRIQUES

Les puces à ADN ont été le premier type de puces développé et sont devenues une méthode très répandue d'analyse dans le domaine de la génomique. Cependant, la compréhension, l'identification et la quantification des processus cellulaires reposent également et en grande partie sur les protéines et leur activité. Les puces à protéines ont donc un fort potentiel pour la recherche protéomique mais aussi pour des applications diagnostiques (67).

Les puces à protéines sont composées d'une surface sur laquelle sont immobilisées de façon régulière un grand nombre de molécules de captures (ou sondes), formant des « spots ». Selon l'application, les éléments immobilisés peuvent être des anticorps ou fragments d'anticorps, des protéines, des peptides ou des extraits complexes de protéines.

L'immobilisation de protéines est plus difficilement standardisée que celle des acides nucléiques. Les protéines sont de nature plus complexes que les molécules d'ADN, elles sont plus fragiles, plus hétérogènes en terme de taille et leur fonctions dépendent de leurs structures tertiaire et quaternaire liées à des forces d'interactions variées (67). De plus, il n'existe pas de moyen d'augmenter la quantité de protéines disponible contrairement à l'ADN qui peut facilement être amplifié par PCR.

Néanmoins, cette technologie permet de fournir des informations qualitatives et quantitatives sur de multiples protéines en parallèle et sur le même échantillon. Dans le domaine médical, les puces à protéines ont un fort potentiel en tant que tests multiparamétriques, notamment pour obtenir des informations d'ordre diagnostique et pronostique grâce aux biomarqueurs (68).

Il existe également de nombreuses autres applications. Elles peuvent par exemple être utilisées comme outil de screening en masse de candidats pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques ou pour l'étude des voies de signalisation et des réseaux de protéines (69). De plus, elles ont un fort potentiel dans la découverte de nouveaux biomarqueurs en rendant possible la quantification massive et parallèle de candidats marqueurs à partir de grands nombre d'échantillons cliniques (54). Ces applications seront plus détaillées dans la troisième partie de ce chapitre.

1. Types de puces à protéines

Les puces à protéines sont généralement divisées en deux grandes classes : les puces fonctionnelles et les puces analytiques (Figure 9).

1.1. Puces à protéines fonctionnelles

Les puces à protéines fonctionnelles sont utilisées pour étudier de façon qualitative les interactions et les modifications de protéines. Une puce fonctionnelle est constituée d'un grand nombre de protéines purifiées provenant d'une cellule spécifique ou d'un organisme, fixées sur un support. Différents types d'interactions peuvent alors être analysés : protéine-protéine, protéine-ADN, protéine-liposome, protéine-médicaments, enzyme-substrat. La puce peut également détecter des récepteurs potentiels si la protéine fixée est un ligand (70–72).

Les utilisations variées en recherche fondamentale de ce type de puce ont été décrites dans plusieurs études. De façon similaire aux puces à ADN pour la génomique, il existe un développement de puces à protéines pour l'étude des interactions protéiques à l'échelle d'un protéome entier (73). Un tel type de puce, sur laquelle étaient fixées environ 5 000 protéines de levure, a par exemple été utilisé pour analyser la spécificité et la réaction croisée de plusieurs anticorps (74).

1.2. Puces à protéines analytiques

Contrairement aux puces fonctionnelles, les puces à protéines analytiques sont utilisées pour détecter et quantifier des protéines dans des échantillons complexes. Elles permettent le suivi de l'expression de protéines à grande échelle (*protein profiling*) (70–72). Elles ont de nombreuses applications qui seront décrites dans un autre paragraphe. La plupart de ces puces utilisent le principe de l'interaction antigène-anticorps. De multiples immunoessais multiplexes et miniaturisés ont ainsi été développés. Il en existe plusieurs formats, souvent divisés en deux principales catégories : les *microarrays* planaires et les *microarrays* non planaires ou en suspension (Figure 10).

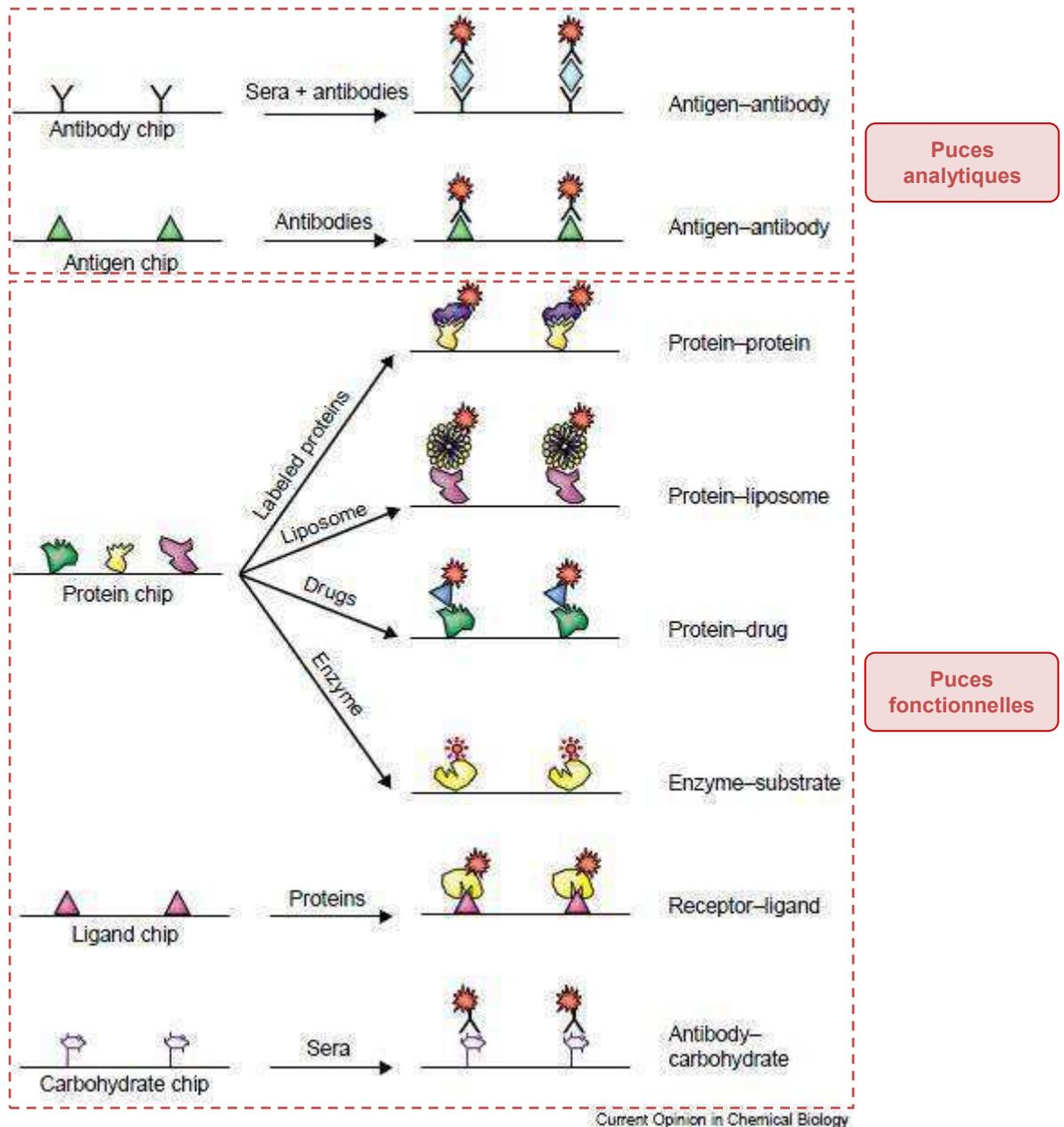


Figure 9 : Types de puces à protéines, d'après (70)

- *Microarrays* planaires

Au sein même des *microarrays* planaires, il existe plusieurs formats que l'on peut classer en deux catégories (Figure 11). La première catégorie correspond aux *forward phase arrays* sur lesquels sont immobilisées des molécules de capture. Chaque spot contient un type de molécule de capture (anticorps ou protéine) et l'ensemble des spots différents permet l'analyse de multiples paramètres dans un seul échantillon. A l'inverse, dans les *reverse phase arrays*, c'est l'échantillon qui est immobilisé sur le support, chaque spot contenant donc de multiples analytes représentant un seul échantillon clinique. Le

microarray inclut alors de multiples échantillons qui sont analysés par une seule molécule de détection (67,69,75).

Les molécules de captures immobilisées sur les *forward phase arrays* sont généralement des anticorps qui détectent des antigènes présents dans l'échantillon. Plusieurs stratégies sont possibles, trois d'entre elles sont présentées sur la Figure 12. La méthode sandwich utilise un couple d'anticorps, le premier est immobilisé sur le support et le second détecte les protéines capturées. Cette méthode peut permettre une meilleure spécificité par rapport à d'autres stratégies car elle utilise deux anticorps reconnaissant des épitopes différents de l'antigène (70,76). Une deuxième possibilité est la capture d'antigène ; les protéines à analyser sont préalablement marquées, permettant une détection sans intermédiaire lors de leur interaction avec les anticorps immobilisés. La méthode directe est similaire mais c'est le mélange de protéines à analyser qui est lui-même immobilisé. La détection se fait par des anticorps marqués et spécifiques de certaines des protéines du mélange (77).

Une autre méthode, non décrite dans la Figure 12, est la stratégie de compétition qui peut augmenter la sensibilité. L'antigène sonde est immobilisé sur le support tandis que l'anticorps de détection est en solution avec l'échantillon contenant l'antigène à détecter. L'antigène sonde et l'antigène de l'échantillon sont donc en compétition pour interagir avec l'anticorps (76).

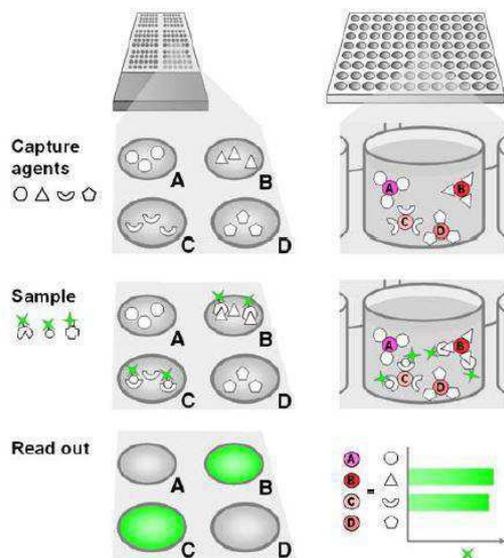


Figure 10 : *Microarrays* planaires (gauche) et non planaires (droite) (67)

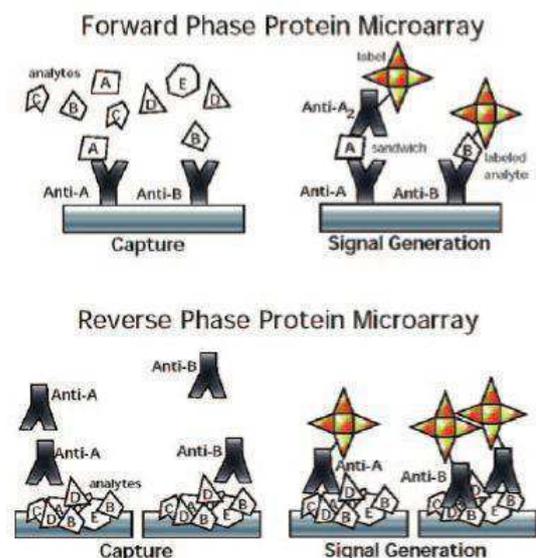


Figure 11 : Les formats *forward* et *reverse phase* des *microarrays* planaires (78)

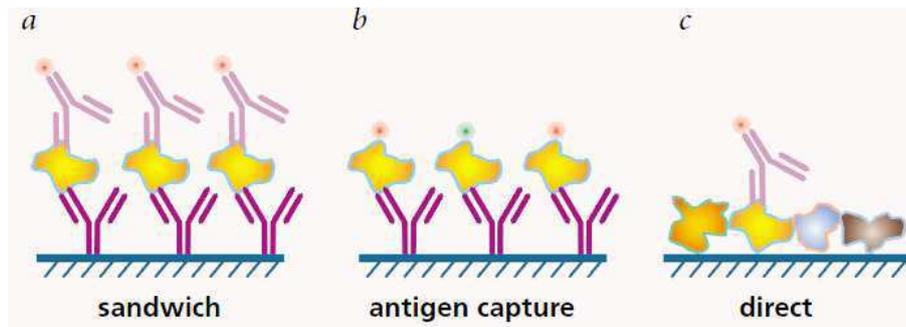


Figure 12 : Stratégies d'immunotests pour la détection de protéines (77)

(a) Méthode sandwich (b) Capture d'antigène (c) Méthode directe

- *Microarrays non planaires*

Ces *microarrays* utilisent des microsphères (« billes ») de tailles ou de couleurs différentes sur lesquelles les molécules de capture sont immobilisées. Les analytes capturés à la surface des billes sont détectés grâce à la cytométrie en flux. La plate-forme la plus populaire est la technologie xMAP® de Luminex qui permet de mettre au point des tests multiparamétriques à partir d'une centaine de billes à code de couleur (67,68,72). Ce sont des billes de polystyrène contenant deux types de fluorochromes qui émettent une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm). L'ensemble des ratios possibles de ces deux fluorochromes permet d'obtenir une centaine de billes de couleurs différentes. Les billes peuvent être couplées à divers agents de capture comme des anticorps, des oligonucléotides, des peptides ou des récepteurs. Deux types de lasers sont utilisés par la détection : le laser rouge permet l'identification de la bille et le laser vert permet la détection de l'interaction entre l'agent de capture présent sur la bille et l'analyte (Figure 13) (79). Cette technologie est utilisée dans de nombreux tests commercialisés (Tableau 13).

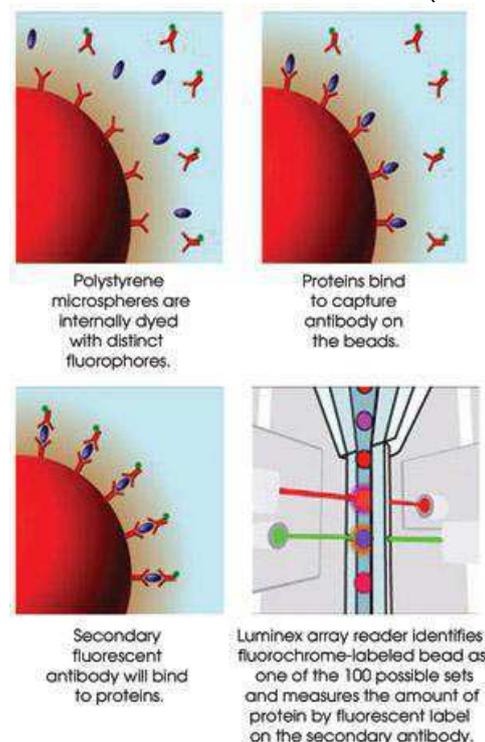


Figure 13 : Analyse de protéines par la technologie xMAP® de Luminex (80)

Tableau 13 : Tests commercialisés basés sur des *microarrays* non planaires (54,81)

Produits	Sociétés	Technologies	Applications
Bio-Plex® Suspension Array System	Bio-Rad	xMAP® (Luminex)	Immunoessais multiplexes, tests personnalisés (Bio-Plex Assay Builder)
WideScreen® BeadPlex® Multiplex Assays	EMD Chemicals	xMAP® (Luminex)	Immunoessais multiplexes
Luminex® Multiplex Protein Assays	Invitrogen	xMAP® (Luminex)	Immunoessais multiplexes
MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Panel	Merck Millipore	xMAP® (Luminex)	Immunoessais multiplexes
Procarta™ Cytokine Assays	Panomics	xMAP® (Luminex)	Immunoessais multiplexes
AimPlex™ Immunoassay Kits	YSL Bioprocess Development	AimPlex™ technology (populations de billes différenciées par leur taille et leur fluorescence)	Immunoessais multiplexes
Fluorokine® Multianalyte Profiling (MAP) Kits	R&D Systems	xMAP® (Luminex)	Immunoessais multiplexes, tests personnalisés
HumanMAP®	Myriad RBM	xMAP® (Luminex)	Immunoessais multiplexes

Ainsi, il existe plusieurs techniques de multiplexage permettant l'analyse de différents paramètres ou échantillons en parallèle. Le Tableau 14 résume les principales caractéristiques des différentes puces à protéines analytiques. Quel que soit le type de puces (fonctionnelle ou analytique), plusieurs étapes sont nécessaires à leur conception. Selon l'application et l'utilisation de la puce, la détermination du type de support, des modes d'interaction, de dépôt, de détection et de révélation sera différente (Figure 14). Même si ces outils sont en amélioration continue, les défis techniques freinent la mise en œuvre de tests multiparamétriques en milieu clinique. Malgré le développement de centaines de tests immunologiques multiparamétriques, seul un nombre limité est approuvé par les autorités compétentes pour une utilisation clinique (68). Ceci souligne bien la complexité de la construction de tests assez robustes pour un usage clinique. De plus, la demande actuelle des cliniciens et des laboratoires d'analyse se définit par une solution haut-débit multiparamétrique permettant la caractérisation de nombreux

échantillons de façon rapide et automatisée ; il n'existe pour l'instant aucun outil répondant à cette demande. Dans ce contexte, AXO Science présente une alternative grâce à sa technologie innovante offrant une solution haut-débit avec automatisation des analyses.

Tableau 14 : Principales caractéristiques des puces à protéines analytiques, d'après (54)

Caractéristiques	Microarrays planaires		Microarrays non planaires (billes)
	Forward phase arrays	Reverse phase arrays	
Immobilisation	Peptide, protéine ou anticorps	Cellules ou lysats de tissus	Peptide, protéine ou anticorps
Marquage de l'analyte	Avec ou sans	Sans	Avec ou sans
Quantification	Relative ou absolue	Relative	Relative ou absolue
Nombre de spots	> 1000	> 1000	≤ 100
Débit	Bas	Bas	Haut
Automatisation	Basse	Bas	Haute

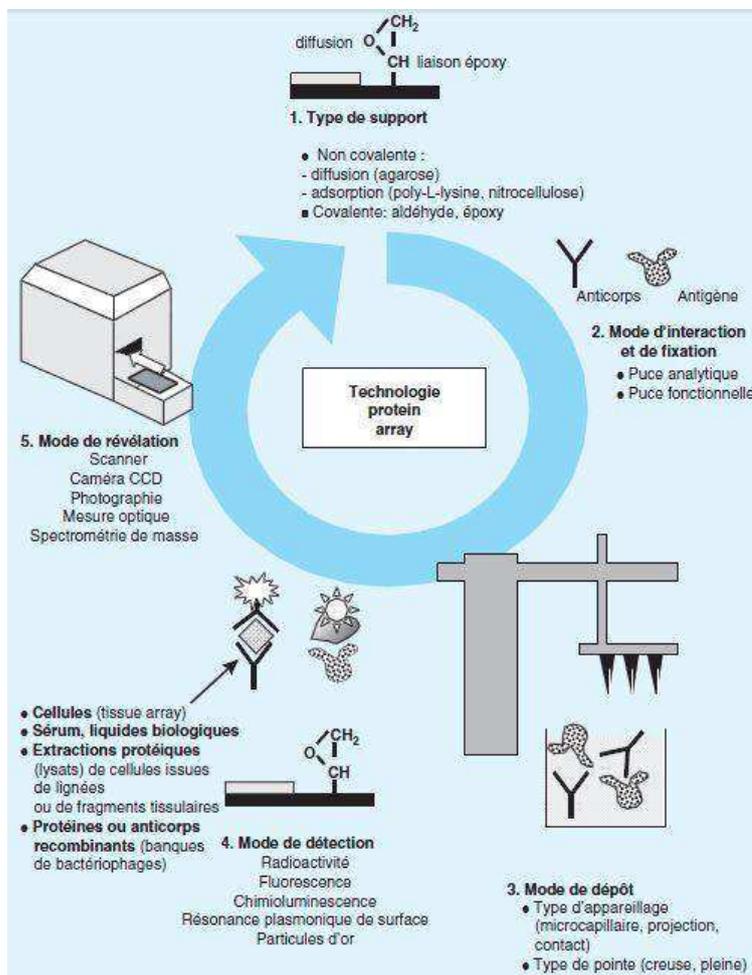


Figure 14 : Mise au point technique d'une puce à protéines, d'après (71)

2. Méthodes de détection

La méthode de détection est un paramètre clé des puces à protéines. De façon générale, il existe deux grandes méthodes de détection : les méthodes utilisant un marquage et les méthodes sans marquage.

2.1. Détection avec marquage

La détection avec des molécules marquées peut se faire de façon directe ou de façon indirecte. La méthode de détection directe implique le marquage de l'échantillon lui-même (Figure 15 a) : toutes les protéines sont alors marquées avec un fluorophore ou un haptène tel que la biotine. Il est également possible d'effectuer un marquage radioactif. Bien que cette dernière technique est une des méthodes de détection les plus sensibles, elle est très peu utilisée du fait de problèmes liés à la contamination radioactive et l'élimination des déchets (72,82,83).

La méthode de détection directe présente l'avantage d'éviter une étape d'incubation supplémentaire. Elle peut cependant altérer la structure des molécules de l'échantillon et donc interférer avec l'interaction entre l'échantillon et les molécules de capture. De plus, toutes les protéines de l'échantillon étant marquées, le bruit de fond peut être augmenté par la fixation non spécifique de certaines protéines telle que l'albumine dans le sérum (83,84). Une alternative aux fluorophores est le marquage des protéines de l'échantillon par un haptène. Ce dernier sera ensuite lui-même détecté au cours d'une seconde incubation. Les haptènes sont des molécules de faible poids moléculaire et ont l'avantage d'être plus stables que les fluorophores et de moins interférer avec les protéines auxquelles ils sont liés (83).

La méthode indirecte utilise généralement des anticorps de détection marqués. Le format le plus utilisé est la méthode sandwich. L'anticorps de détection peut être lui-même directement marqué ou être reconnu par un anticorps secondaire marqué (Figure 15 b). Cette stratégie peut être assimilée à une technique ELISA sous format miniaturisé. Les anticorps sont marqués par des fluorophores (immunofluorescence) ou par des enzymes (tests immunoenzymatiques). Les enzymes les plus souvent couplées aux anticorps sont la peroxydase de raifort (HRP, horseradish peroxydase) et la phosphatase alcaline. La HRP catalyse l'oxydation du luminol en aminophthalate en présence de peroxyde d'hydrogène menant à une émission de lumière (chimiluminescence) tandis que la phosphatase alcaline hydrolyse les liaisons ester monophosphate rendant certains de ses substrats colorés (détection colorimétrique) (85).

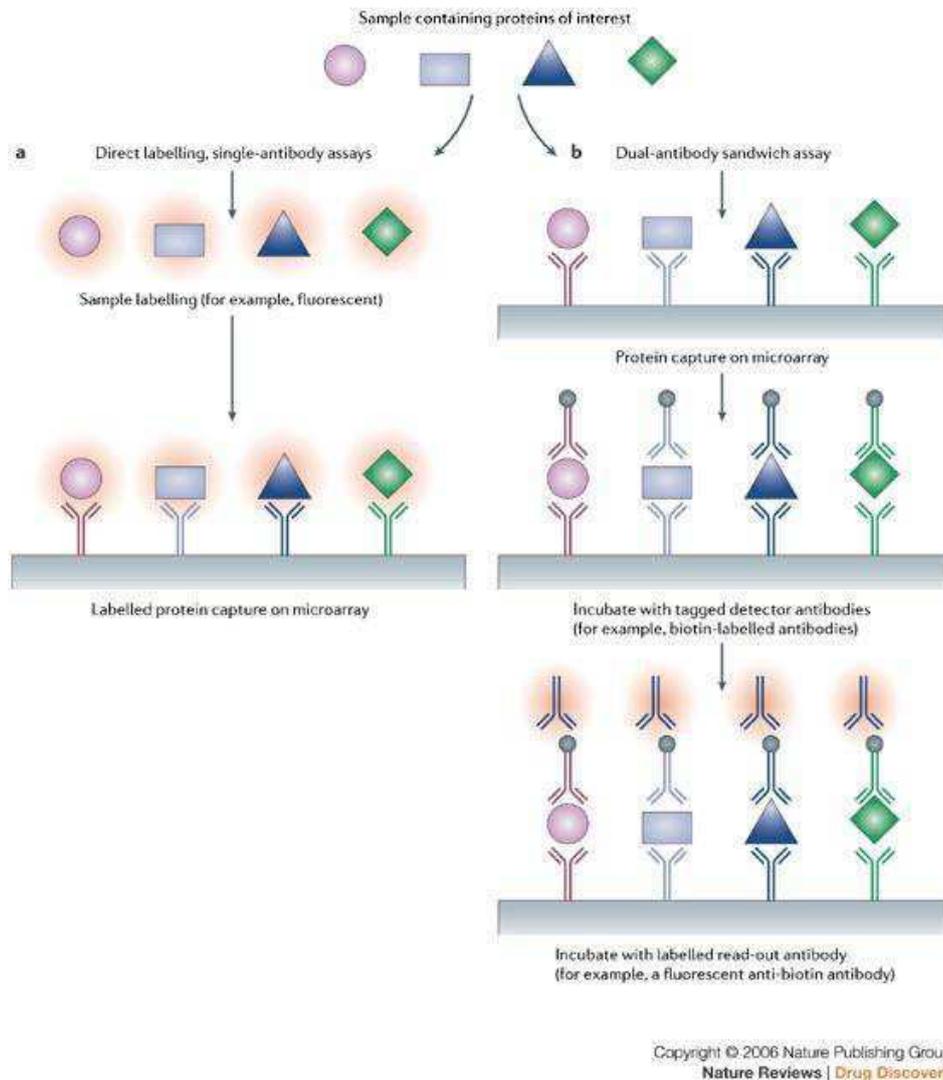


Figure 15 : Exemples de deux méthodes de détection avec marquage, d'après (86)
 (a) Marquage direct (b) Marquage indirect : immunoessai en sandwich avec anticorps primaire et secondaire

Pour augmenter la sensibilité de la détection, plusieurs méthodes de marquage avec amplification du signal ont été développées. Une de ces méthodes est la *rolling circle amplification* (RCA) qui utilise l'amplification de l'ADN pour détecter des anticorps liés aux protéines d'intérêt. Cette stratégie repose sur l'extension enzymatique d'un conjugué anticorps-amorce puis la détection du brin d'ADN généré par hybridation de sondes marquées (Figure 16). Elle offre une sensibilité élevée, une gamme dynamique étendue et une bonne reproductibilité (72,87,88).

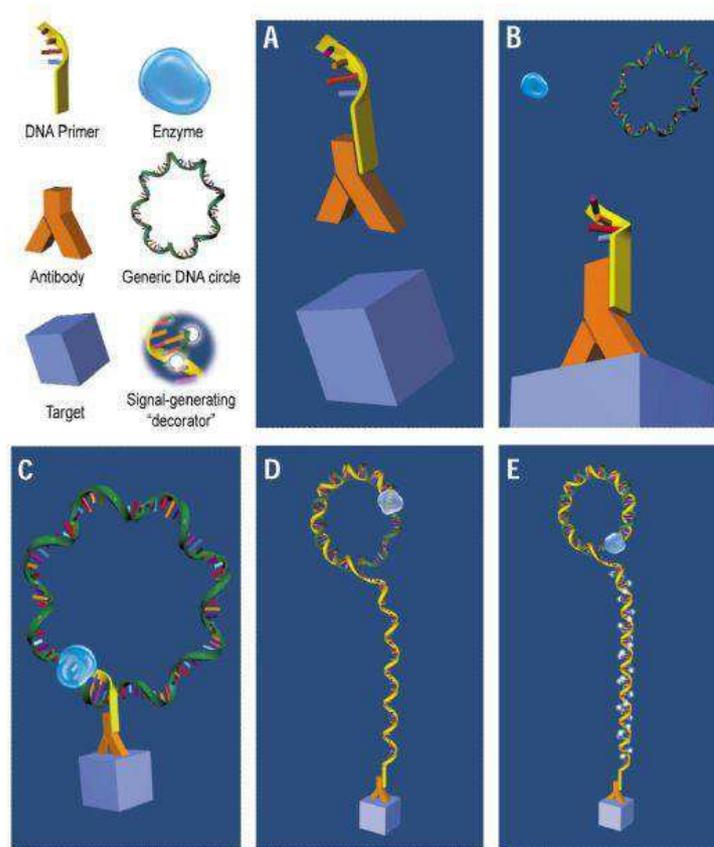


Figure 16 : Immunoessai avec amplification de signal par RCA, d'après (87)

(A) Une amorce d'oligonucléotides est liée à l'anticorps de détection. **(B)** Le conjugué anticorps-ADN se lie spécifiquement à la molécule cible. **(C)** Une molécule d'ADN circulaire s'hybride à sa séquence complémentaire sur l'amorce du conjugué. Il y a réplication circulaire de l'ADN en présence d'ADN polymérase et de nucléotides. **(D)** Un long brin d'ADN est généré et reste fixé à l'anticorps. **(E)** Ce brin d'ADN est détecté par hybridation d'amorces complémentaires fluorescentes.

2.2. Détection sans marquage

Il est aussi possible de détecter l'interaction antigène-anticorps sans utiliser de marquage. Il existe plusieurs systèmes de détection sans marquage comme la spectrométrie de masse et la SPR (*surface plasmon resonance*) qui permet également la détection en temps réel. Ces systèmes ont l'avantage de ne pas perturber la fonctionnalité des molécules, contrairement aux méthodes utilisant des marqueurs (72,77,89).

La SPR est une technique basée sur la génération de plasmons de surface (ondes oscillantes qui se déplacent à la surface d'une couche métallique). Les plasmons de surface sont sensibles aux changements dans l'environnement proche de l'interface et ont donc un potentiel en tant qu'outil de détection. La technique est utilisée pour détecter l'interaction des molécules biologiques avec les sondes fixées sur la surface d'or (liaison antigène-anticorps par exemple). La détection peut se faire en temps réel (SPRi, SPR

imaging) grâce à une caméra CCD visualisant les spots et enregistrant l'évolution de la réflectivité (Figure 17) (89,90).

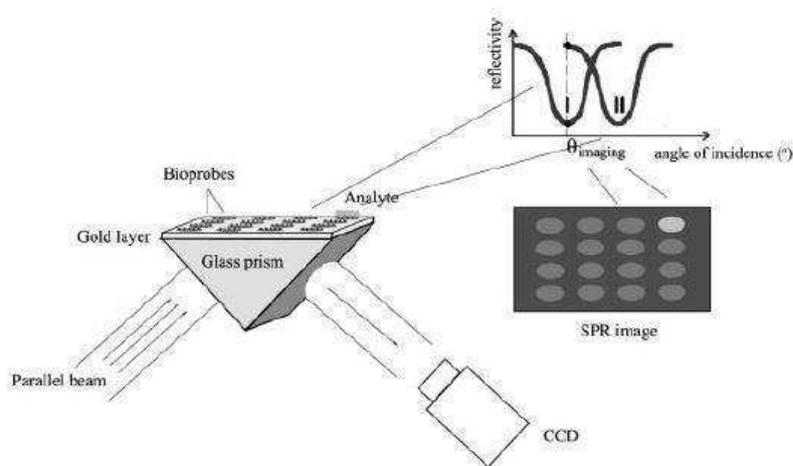


Figure 17 : Principe général de la détection par SPRi, d'après (90)

Les sondes sont immobilisées sur la surface d'or du prisme. Lors de l'injection de l'échantillon, l'analyte correspondant interagit avec la sonde. La réflectivité de la lumière incidente est mesurée, elle est corrélée à l'évolution de la surface.

En plus d'avoir l'avantage d'être sans marquage, la détection par SPR a aussi le potentiel d'analyser plusieurs échantillons en réutilisant la même surface sur laquelle sont immobilisées les sondes (91).

3. Applications

Les puces à protéines ont des applications dans divers domaines. Une des principales applications est la recherche protéomique. Les puces à protéines sont en effet intéressantes pour l'étude et la modélisation des réseaux de protéines et des voies de signalisation (70,82). La première puce à protéome a été développée par Zhu et al. et a permis d'identifier les interactions protéines-protéines et protéines-phospholipides chez la levure grâce à l'immobilisation de protéines sur une lame de microscope (92).

La compréhension des réseaux de protéines ou des voies de signalisation est également très importante pour certaines pathologies. L'utilité des puces à protéines tient à leur capacité d'élaborer des profils de réseaux moléculaires à partir d'échantillons cellulaires de patients (75). Dans ce contexte, un des domaines de recherche exploitant les puces à protéines est la caractérisation de l'immunité humorale dans les processus allergiques, les maladies auto-immunes, les cancers et les maladies infectieuses. En effet, il est possible de détecter des changements de l'immunité humorale grâce à l'immobilisation d'allergènes, d'auto-antigènes ou d'épitopes sur des puces (86).

De telles puces permettent également d'étudier des groupes importants de protéines comme les kinases qui sont fortement impliquées dans la signalisation cellulaire. Pour étudier l'activité de la tyrosine kinase c-Src, une puce à peptides a été développée par Houseman et al. (93). Des peptides ont été utilisés comme substrats et immobilisés sur un support pour caractériser l'activité de la kinase. L'interaction et la spécificité enzyme-substrat ont été étudiées notamment par SPR et fluorescence. Les peptides ont l'avantage d'être plus stables que les protéines et peuvent être directement synthétisés sur une surface pour former une puce à peptides de haute densité.

Etant impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, les kinases peuvent également être des cibles potentielles dans le traitement de cancers (54). Des échantillons tissulaires de cancer du sein ont été analysés par une puce de type *reverse phase array*. L'étude a permis de définir des sous-groupes de tumeurs selon le degré de phosphorylation et les profils de signalisation. Ainsi, cette caractérisation détaillée de l'activité de signalisation pourrait être d'une grande utilité dans la conception de thérapies dans le cadre de la médecine personnalisée (94).

Les puces à protéines jouent plusieurs rôles dans le développement de nouvelles thérapeutiques. Elles permettent la découverte de nouveaux ligands ou molécules thérapeutiques se liant spécifiquement aux molécules cibles immobilisées sur la puce (69) mais ce sont également des outils à haut-débit pour la validation de ces molécules thérapeutiques candidates lors des essais précliniques et cliniques (82).

La découverte de biomarqueurs est une autre application clé des puces à protéines (Figure 18). La recherche de nouveaux marqueurs biologiques par cette technologie, selon diverses approches, a déjà été décrite dans le chapitre dédié aux biomarqueurs (Partie III). Les puces à protéines se sont aussi révélées être une bonne approche pour les études de validation des biomarqueurs car elles font partie des technologies à haut-débit pouvant atteindre une sensibilité analytique élevée tout en étant automatisée (54).

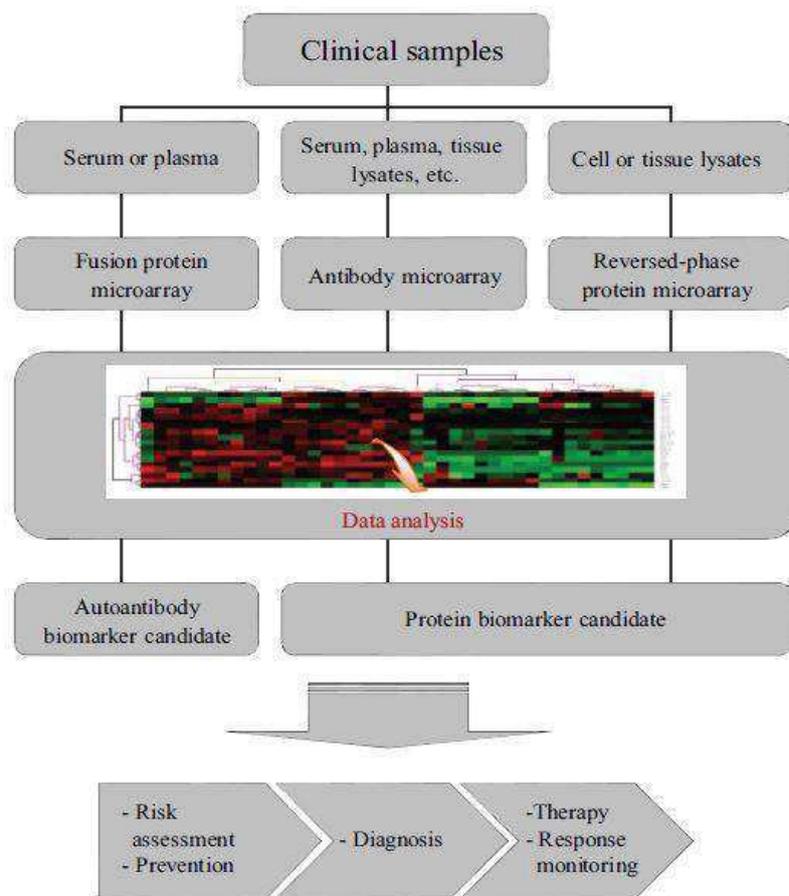


Figure 18 : Applications des puces à protéines pour la découverte de biomarqueurs et leurs applications en médecine personnalisée (54)

Enfin, le diagnostic *in vitro* est une autre application principale des puces à protéines. Elles sont alors utilisées pour la détection d'antigènes ou d'anticorps dans des échantillons cliniques comme le sérum. Par exemple, un test d'allergie a été développé avec 94 allergènes purifiés immobilisés sur une puce. Elle permet la détermination et le suivi des profils d'IgE (immunoglobuline E) de patients allergiques à partir d'un faible volume de sérum et pourrait remplacer la sérologie (95).

Dans le domaine des biomarqueurs, les puces à protéines ne sont pas uniquement utilisées pour la découverte et la validation de biomarqueurs, elles peuvent également servir de support pour leur détection et quantification dans un contexte clinique de diagnostic, de pronostic, de décision thérapeutique ou de suivi d'un patient notamment en oncologie. De nombreuses puces incluant des biomarqueurs sont en développement mais leur utilisation clinique nécessite plusieurs étapes de validation analytique. Les puces à ADN sont pour l'instant plus utilisées en clinique que les puces à protéines (Tableau 15) et la National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) ne recommande pas encore l'utilisation de puces à protéines pour des applications cliniques car leur niveau de preuve est insuffisant (Tableau 16).

Tableau 15 : Tests commercialisés basés sur des puces à ADN ou à protéines avec une application en oncologie, adapté de (96)

Produit	Type de puce	Applications	Société
Amplichip CYP450	ADN	Identification des variations de deux gènes clés du métabolisme des médicaments : CYP2D6 et CYP2C19 (pharmacogénomique)	Roche
MammaPrint®	ADN	Analyse de 70 gènes pour le pronostic du cancer du sein	Agendia
CupPrint	ADN	Analyse de l'expression de gènes pour l'identification de tumeurs primaires inconnues	
p53 GeneChip	ADN	Séquençage du gène p53 et identification des mutations	Affymetrix
Tumor PSA Array	protéine	Mesure des marqueurs tumoraux tPSA, fPSA et CEA (cancer de la prostate)	Randox
Tumor Monitoring Array	protéine	Mesure des marqueurs tumoraux CEA, AFP et β hCG	
RanplexCRC Array	ADN	Détection de 28 mutations sur 4 gènes liés au cancer colorectal (TP-53, APC, KRAS, BRAF)	
KRAS/BRAF/PIK3CA Array	ADN	Détection des mutations des gènes KRAS, BRAF et PIK3CA pour la sélection de patients pour une thérapie anti-EGFR (cancer colorectal)	

AFP, alpha-fœtoprotéine ; APC, adenomatous polyposis coli; CEA, carcino embryonic antigen; EGFR, epidermal growth factor receptor ; fPSA, free prostate specific antigen; PIK3CA, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha ; TP-53, tumor protein 53; tPSA, total prostate specific antigen.

Tableau 16 : Recommandations du NACB pour l'utilisation des puces en oncologie, d'après (96)

Type de puces	Recommandations
<p>Puces à ADN pour l'étude de l'expression de gènes</p>	<p>Ce sont des outils nouveaux et prometteurs en cancérologie pour le diagnostic, le pronostic, la prédiction de réponse au traitement, le suivi et la sélection du traitement.</p> <p>La plupart des études publiées montre un niveau de preuve V. Par conséquent, ces puces devraient être utilisées comme outils de recherche mais pas comme outils pour la prise de décisions cliniques.</p> <p>Il est nécessaire d'établir une standardisation et une validation clinique de ces puces.</p> <p>Des programmes d'assurance qualité et de contrôle qualité doivent être d'avantage développés.</p>
<p>Tissue microarrays</p>	<p>Ce sont des outils adaptés à l'analyse haut-débit d'un grand nombre d'échantillons et sont recommandés pour une utilisation dans des essais cliniques et des études rétrospectives pour évaluer et valider de nouveaux marqueurs tumoraux par analyse immunohistochimique.</p>
<p>Puces à ADN pour l'analyse du polymorphisme nucléotidique</p>	<p>Elles sont recommandées pour établir les haplotypes et pour les corrélés à une prédisposition à la pathologie.</p>
<p>Puces à ADN pour le génotypage et la détection de mutations</p>	<p>Leur utilisation est recommandée pour le diagnostic du cancer et pour la pharmacogénomique.</p> <p>Plus de validation est nécessaire pour assurer des résultats équivalents entre les technologies standards (comme le séquençage) et l'analyse par puce.</p>
<p>Puces à protéines</p>	<p>Elles sont recommandées comme outils de recherche pour l'analyse multiparamétrique d'un grand nombre de protéines.</p> <p>Le niveau de preuve n'est pas encore suffisant pour des applications cliniques.</p>
<p>Recommandations générales</p>	<p>L'automatisation est encouragée pour améliorer la reproductibilité, le débit et la robustesse.</p>
	<p>Des protocoles standardisés devraient être élaborés pour la collecte d'échantillons et leur manipulation.</p>

4. Problématiques de validation et de qualité des puces à protéines

Le format particulier des puces (à protéines ou à ADN) présente plusieurs avantages comme une potentielle haute sensibilité, la nécessité de plus faibles quantités de réactifs et d'échantillons, la diminution des temps d'incubation et la perte minimale de réactifs notamment grâce à la miniaturisation des tests. De plus, la mesure simultanée de plusieurs protéines à partir d'un seul échantillon limite la manipulation des échantillons, augmente le débit et réduit le coût de main d'œuvre (97).

Les puces présentent cependant des lacunes au niveau de leur validation et de leur contrôle qualité nécessaires pour une utilisation clinique. La technologie des biopuces est encore en évolution ; il existe des difficultés de normalisation car il n'existe pas encore de référence (*gold standard*) permettant une comparaison inter-laboratoire ou entre plates-formes des données.

D'autre part, l'aspect multiplexe de ces outils apporte des difficultés analytiques et de contrôle qualité spécifiques. La difficulté analytique principale est de parvenir à optimiser la puce sous un format commun qui fonctionne pour chaque protéine à analyser puisque tous les analytes sont soumis aux mêmes conditions (temps d'incubation, température, étapes de lavage, système de détection, etc.). Le multiplexage apporte également une difficulté en termes de dilution des échantillons. Il faut en effet trouver un facteur de dilution commun permettant à toutes les concentrations de protéines à analyser d'être dans leurs gammes dynamiques. S'il n'est pas possible d'établir un facteur de dilution commun, une solution possible est de fractionner les analytes en panels selon leur niveau de dilution (97).

Concernant le contrôle qualité, la plupart des puces à protéines incluent maintenant des contrôles permettant de suivre les performances de l'analyse et d'évaluer la qualité des données analytiques. Parmi ces contrôles, on retrouve des spots pour les contrôles positifs, négatifs, de normalisation, de liaison non spécifique et de réactivité croisée (67,98,99).

Il est possible d'appliquer les méthodes de contrôle qualité et d'assurance qualité de tests classiques d'analyse de protéines pour des puces de faible densité. Toutefois il est plus difficile de les appliquer à des puces possédant un multiplexage élevé. L'interprétation des résultats de contrôle qualité fait partie de la problématique. Si certains contrôles ne sont pas validés pour une ou plusieurs protéines, il est difficile de savoir comment procéder : rejeter tous les résultats de la puce ou valider sélectivement des données pour les protéines pour lesquelles le contrôle qualité est validé (67,68).

Les tests multiparamétriques génèrent une grande quantité de résultats et nécessitent donc une analyse appropriée des données. Elaborer des règles pour l'interprétation des

données et la détermination de l'acceptabilité des résultats est un défi important. Ceci doit également être mis en relation avec l'impact clinique qu'auront les résultats du test. Il faut prendre en considération la finalité du test : si l'on attend de la puce un résultat de diagnostic ou si le test est utilisé uniquement pour avoir des informations complémentaires (67,97).

Un projet de contrôle de la qualité des puces à ADN, Microarray Quality Control Project (MAQC), a été mis en place pour aider au développement de la standardisation des rapports de données, des outils d'analyse et des contrôles, notamment pour les puces dédiées à l'évaluation de l'expression du génome. De telles initiatives seraient également bénéfiques pour les puces à protéines (97,100).

PARTIE V

TRAVAUX DE RECHERCHE

Dans le cadre du projet DIPROMON, une plate-forme technologique sera développée pour la mesure des profils de biomarqueurs de patients atteints de cancer de la vessie dans le but d'établir une stratification de ces patients. La première étape du projet est en cours de réalisation. Elle consiste à sélectionner un panel de marqueurs biologiques impliqués dans le cancer de la vessie.

Pour débiter le développement du test multiparamétrique, trois interleukines ont été choisies pour leur potentiel intérêt dans le cancer de la vessie : IL6, IL8 et IL10. En effet, il a été montré que l'IL6 était surexprimée dans des échantillons de cancer de la vessie et, récemment, qu'elle pourrait être un facteur prédictif de stade clinique ainsi que du pronostic du cancer de la vessie (101). Des concentrations urinaires élevées d'IL8 sont également associées aux cancer de la vessie (102) tandis que l'IL10 joue un rôle important de régulation dans l'immunosurveillance du cancer de la vessie et dans l'immunothérapie par le BCG (103).

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels

La streptavidine marquée par la phosphatase alcaline (SAV-PA) et la solution de BCIP/NBT prête à l'emploi proviennent de Sigma-Aldrich (Lyon, France).

Les anticorps de capture anti-IL6 humaine (clone MQ2-13A5) et anti-IL10 humaine (clone JES-9D7), les anticorps biotinylés anti-IL6 humaine (MQ2-39C3) et anti-IL10 humaine (JES3-12G8), ainsi que les protéines recombinantes IL6 et IL10 humaines ont été fournis par eBioscience (San Diego, USA). Les anticorps sont développés chez la souris.

L'anticorps de capture anti-IL8 humaine (clone H8A5), l'anticorps biotinylé anti-IL8 humaine (clone E8N1) et la protéine recombinante anti-IL8 humaine ont été fournis par BioLegend (San Diego, USA). Les anticorps anti-IL8 sont murins.

Le tampon LowCross Buffer et l'urine humaine utilisée comme matrice biologique proviennent respectivement de Candor Bioscience (Wangen, Allemagne) et d'UTAK Laboratories (Valencia, USA).

1.2. Spotting

Les sondes sont préparées dans du tampon (acétate de sodium 0,1M ; KCl 0,1M ; bleu de bromophénol 1 mg/mL, pH 5,5). Les anticorps ont une concentration finale de 450 µg/mL. Ces solutions sont spottées sur un substrat adhésif TKL (AXO Science, France) avec un spotter piézoélectrique (sciFLEXARRAYER S3, Scienion, Allemagne) puis le substrat est assemblé avec une plaque de microtitration sans fond de 96 puits. Cette approche de *microarray* adhésif a été développée par AXO Science (104).

Chaque puits contient alors une matrice de 49 spots de sondes (Figures 19 et 20).

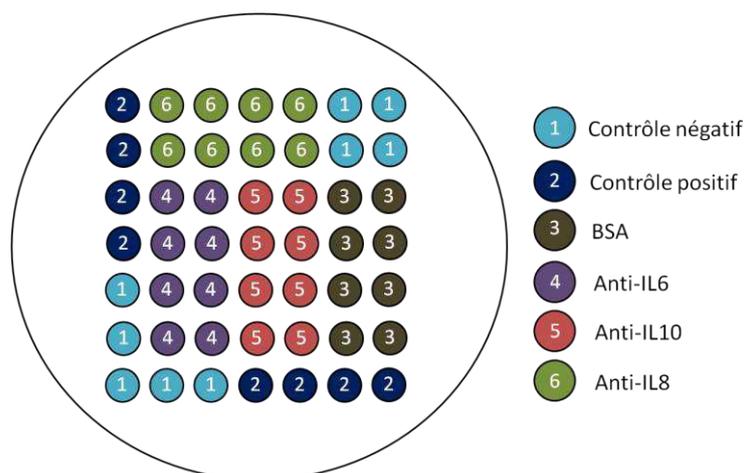


Figure 19 : Matrice des sondes immobilisées

Le contrôle négatif correspond à la solution de tampon contenant du bleu de bromophénol (1 mg/ml). Le contrôle positif correspond à une solution de SAV-PA (0,5 mg/mL). Les spots de BSA (0,5 mg/mL) permettent d'identifier la fixation non-spécifique des réactifs.



Figure 20 : Image d'un puits après immobilisation des sondes (avant l'immunoessai)

1.3. Immunoessai en sandwich

Les immunotests pour le dosage des interleukines 6, 8 et 10 ont été effectués sur un automate EVO75 (TECAN, Suisse) avec un bloc chauffant maintenant la plaque de microtitration à 37°C. Le protocole utilisé est le suivant :

- i. Les puits de la plaque sont saturés avec du LowCross Buffer.
- ii. Les solutions d'interleukines et la solution contenant les trois types d'anticorps biotinylés sont incubées ensemble dans les puits pendant 30 minutes ou 1 heure.
- iii. La streptavidine marquée par la phosphatase alcaline (2 µg/mL, diluée dans du LowCross Buffer) est incubée dans chaque puits pendant 30 minutes.
- iv. La solution de BCIP/NBT est incubée dans chaque puits pendant 30 minutes pour générer le signal colorimétrique.
- v. Un tampon acétate (0,1 M, pH 3) est ajouté dans chaque puits.

Le protocole inclut un lavage par du PBS entre les quatre premières étapes.

A la fin du protocole, la plaque de microtitration est lue par un lecteur CLAIR (Sensovation, Allemagne). Les images obtenues sont analysées par le logiciel AXOware (version 1.3.7) qui calcule l'intensité de signal pour chaque spot.

2. Résultats

La première étape de la mise au point du test de dosage quantitatif est la réalisation des gammes d'étalonnage à partir des trois interleukines recombinantes. Les gammes doivent ensuite être validées en utilisant l'urine humaine comme matrice biologique car l'objectif final est de quantifier ces marqueurs dans des échantillons urinaires.

2.1. Preuve de concept avec les concentrations d'anticorps non optimisées

Initialement, les dilutions des protéines sont faites dans le LowCross Buffer. Un exemple des premiers résultats obtenus est présenté sur la Figure 21.

Chaque puits correspond à une solution d'une seule interleukine d'une concentration définie. En analysant les images des puits avec le logiciel AXOware, l'intensité moyenne du signal de chaque spot du puits est calculée. Il existe plusieurs spots (réplicats) pour chaque anticorps anti-interleukine, la moyenne de l'intensité de ces spots est donc ensuite calculée puis corrigée par soustraction du bruit de fond (correspondant à l'intensité moyenne du groupe de spots de contrôle négatif). Les courbes ajustées sont obtenues à partir d'un logiciel d'ajustement à quatre paramètres (*four points fitting curve*).

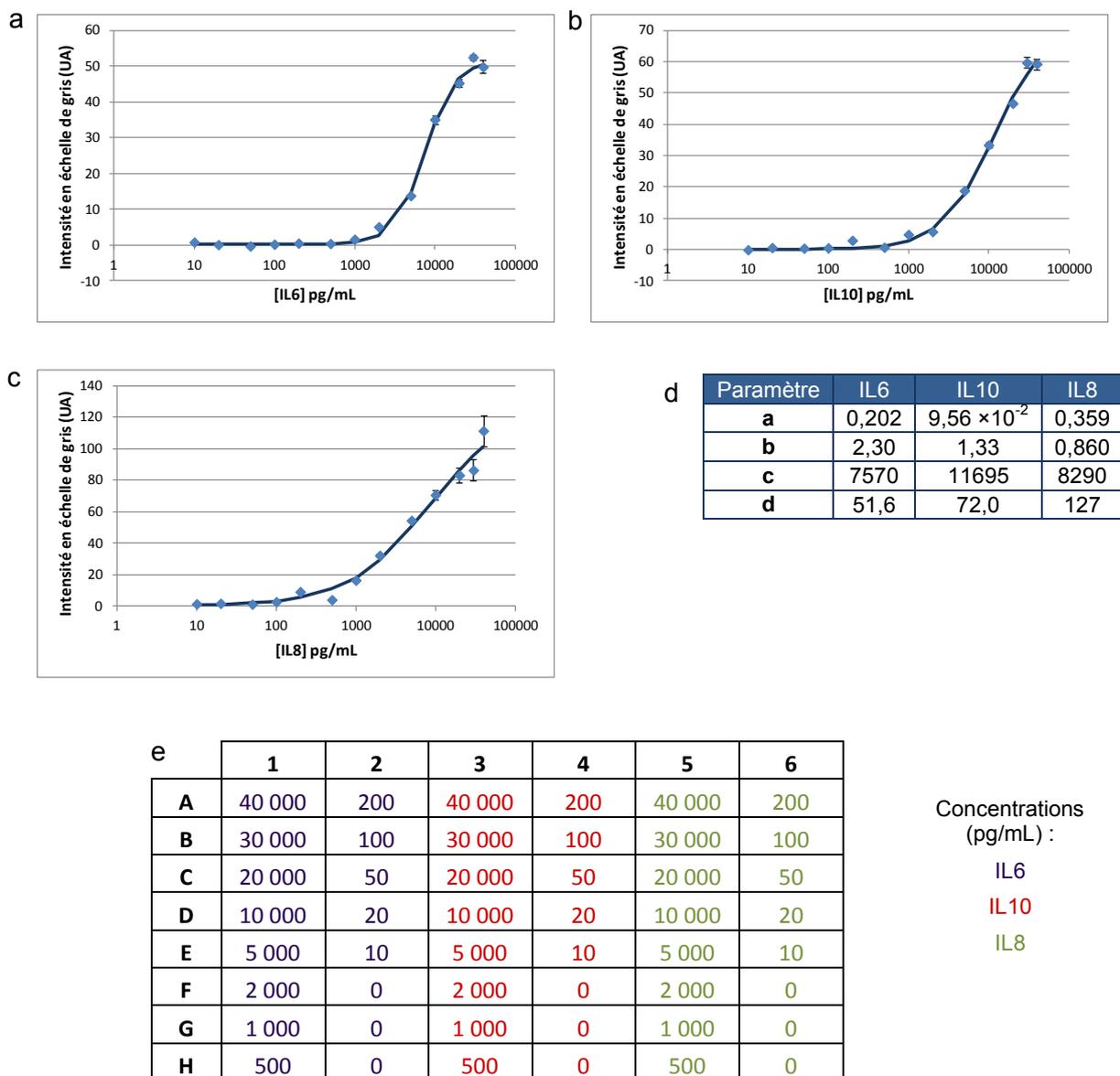


Figure 21 : Preuve de concept

Courbes d'étalonnage de l'IL6 (a), l'IL10 (b) et l'IL8 (c). Les traits pleins correspondent aux courbes ajustées grâce à la méthode «four points fitting curve». Les dilutions des protéines sont faites dans le LowCross Buffer. Dilutions des anticorps de détection : anti-IL6 : 1/10000 ; anti-IL10 : 1/10000 ; anti-IL8 : 1/2000.

(d) Tableau des paramètres des courbes ajustées suivant l'équation : $y = d + (a-d) / (1,0 + (x/c)^b)$

(e) Composition de la plaque d'échantillons (pour les concentrations nulles de protéines, les puits contiennent seulement du LowCross Buffer).

Les intensités obtenues pour les gammes de concentrations des trois interleukines donnent une courbe d'allure sigmoïde (dont le plateau n'est pas visible avec les concentrations de protéines utilisées). Le choix des couples d'anticorps semble donc adéquat pour réaliser une courbe d'étalonnage. L'étape suivante consiste à vérifier que les réactifs ont le même comportement dans une matrice biologique plus complexe, l'urine humaine.

2.2. Vérification de l'activité des anticorps dans un milieu complexe : l'urine

Le même type de gamme a été réalisé en remplaçant le LowCross Buffer par de l'urine humaine (Figure 22).

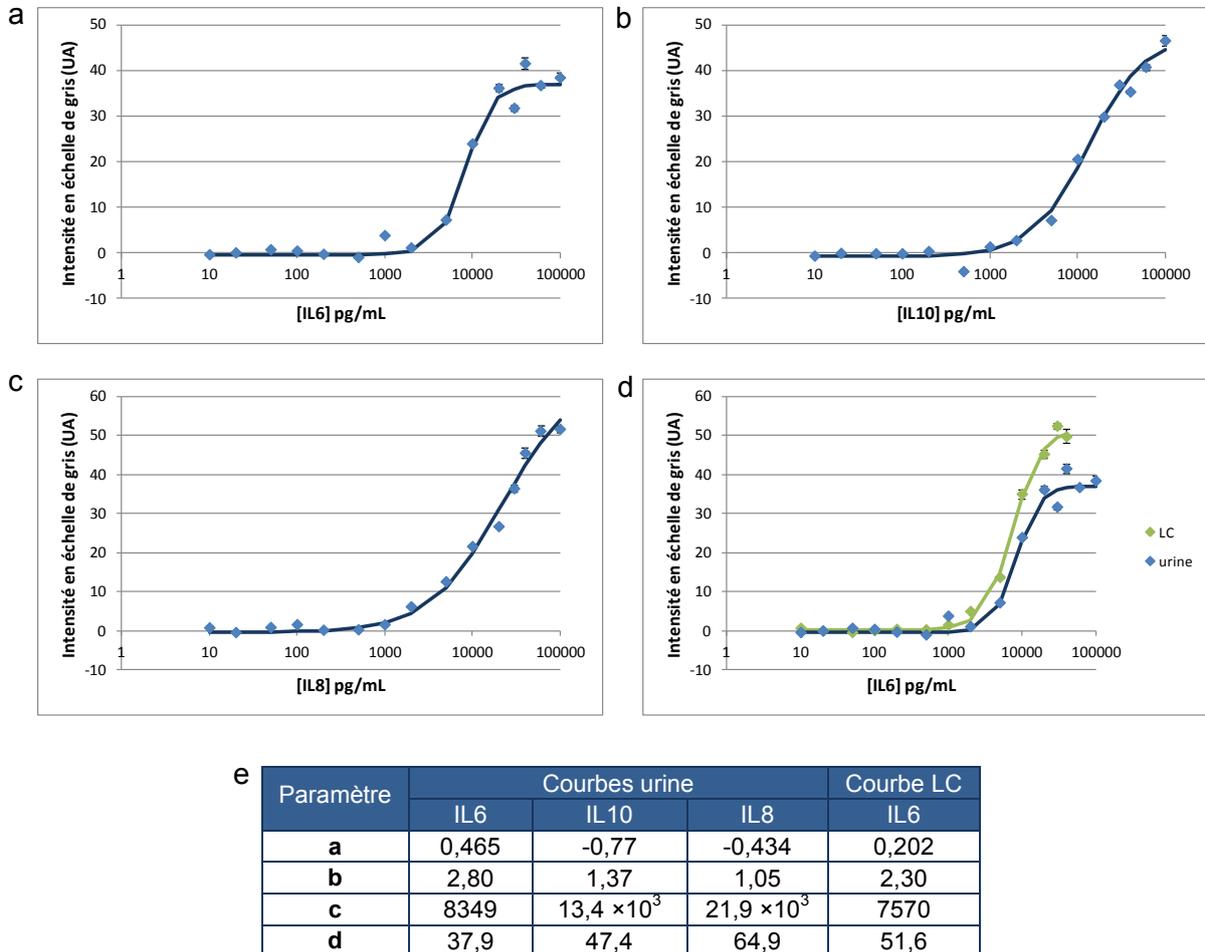


Figure 22 : Activité des anticorps dans l'urine

Courbes d'étalonnage de l'IL6 (**a**), l'IL10 (**b**) et l'IL8 (**c**). Les traits pleins correspondent aux courbes ajustées. Les dilutions des protéines sont faites dans l'urine humaine.

Dilutions des anticorps de détection : anti-IL6 : 1/10000 ; anti-IL10 : 1/25000 ; anti-IL8 : 1/25000.

(**d**) Comparaison des courbes de l'IL6 dans le LowCross Buffer (LC) et dans l'urine humaine. La comparaison est plus difficile pour les deux autres interleukines car les concentrations d'anticorps de détection sont différentes.

(**e**) Tableau des paramètres des courbes ajustées suivant l'équation : $y = d + (a-d) / (1,0 + (x/c)^b)$

La réalisation des gammes d'interleukines en utilisant l'urine humaine comme matrice biologique est donc possible et les résultats sont similaires à ceux obtenus avec le LowCross Buffer. On remarque cependant qu'il existe une différence de sensibilité analytique selon la matrice utilisée (Figure 22d). Dans les deux cas, la limite de détection est insuffisante car elle se situe autour de 10 000 pg/mL alors que les valeurs seuils des interleukines sont plus basses (à titre indicatif, les valeurs seuils pour l'IL6, l'IL10 et l'IL8 sont autour de 20 pg/mL dans le sérum (105)). Ainsi, il est nécessaire d'optimiser la méthode d'immuno-analyse.

2.3. Optimisation du test

- Choix des concentrations d'anticorps de détection

Pour choisir la concentration appropriée, une gamme est réalisée pour chacun des anticorps biotinylés. A l'inverse des expériences précédentes, la concentration d'anticorps varie tandis que la concentration en interleukines est fixe. Les résultats de ces gammes d'anticorps sont présentés dans l'Annexe II. Chaque gamme montre une diminution progressive de l'intensité du signal à partir d'une certaine dilution. La concentration choisie pour le test se situe avant cette diminution.

Les nouvelles concentrations d'anticorps de détection permettent d'améliorer l'aspect des courbes d'étalonnage et d'obtenir une meilleure limite de détection (Figure 23). On remarque également que l'intensité du signal généré est plus élevée pour les trois interleukines. L'intensité maximale est multipliée par 2,5 pour l'IL6 et a doublé pour l'IL8.

- Temps d'incubation

La durée d'incubation optimale des interleukines et des anticorps de détection permet l'obtention de l'équilibre de la réaction. Le temps initial d'incubation était de 30 minutes, il a ensuite été augmenté à une heure.

En comparant les résultats obtenus pour ces deux durées (Figure 24), on remarque que la sensibilité du dosage augmente avec le temps d'incubation. En effet, le temps d'incubation plus long améliore la capacité de liaison des protéines et des anticorps. En utilisant les concentrations optimisées d'anticorps de détection, on obtient alors une meilleure limite de détection lorsque le temps d'incubation est d'une heure par rapport à un temps d'incubation de 30 minutes.

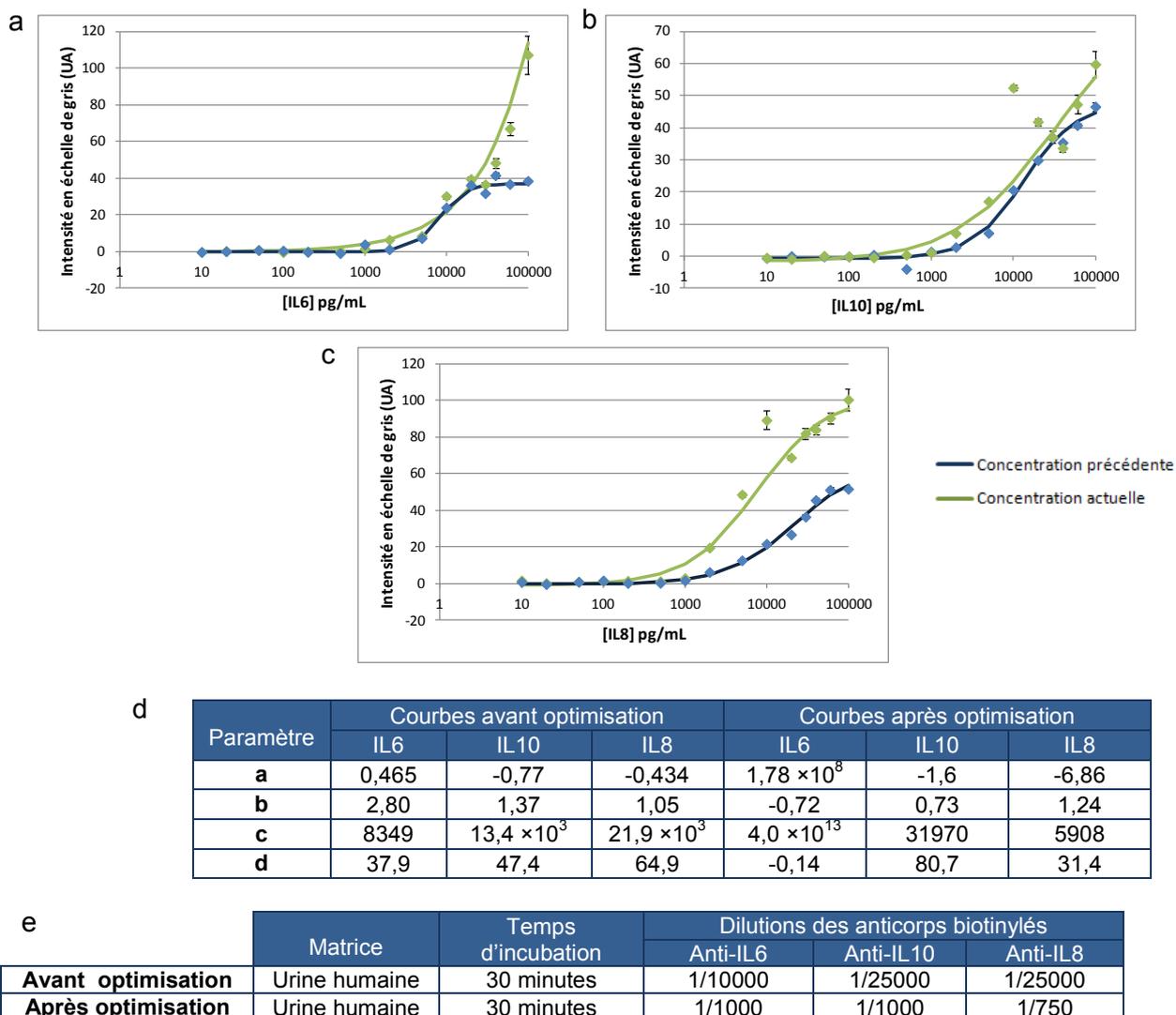


Figure 23 : Choix des concentrations d'anticorps de détection

Comparaisons des courbes d'étalonnage (courbes ajustées) de l'IL6 (**a**), l'IL10 (**b**) et l'IL8 (**c**) avant et après le choix de la concentration optimale d'anticorps de détection.

(**d**) Tableau des paramètres des courbes ajustées suivant l'équation : $y = d + (a-d) / (1,0 + (x/c)^b)$

(**e**) Tableau comparatif des paramètres utilisés pour l'expérience avant et après optimisation des concentrations.

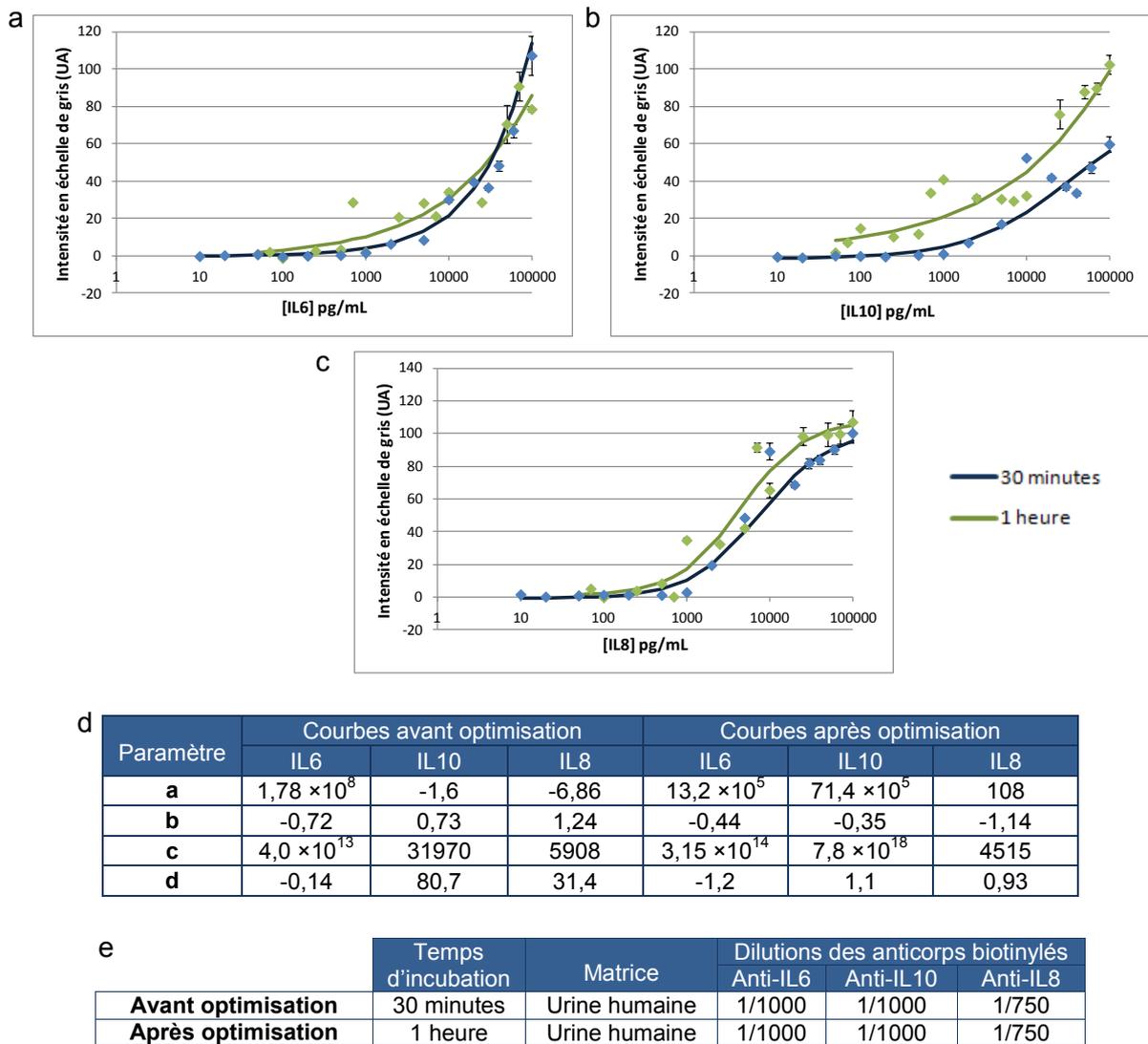


Figure 24 : Temps d'incubation

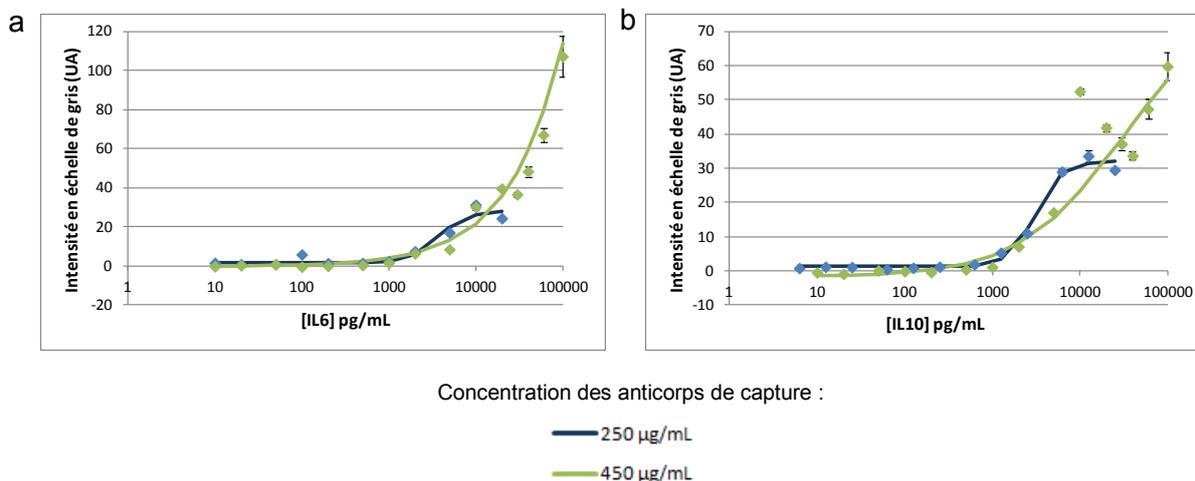
Comparaisons des courbes d'étalonnage (courbes ajustées) de l'IL6 (a), l'IL10 (b) et l'IL8 (c) avec une phase d'incubation des interleukines et anticorps de détection de 30 minutes ou 1 heure.

(d) Tableau des paramètres des courbes ajustées suivant l'équation : $y = d + (a-d) / (1,0 + (x/c)^b)$

(e) Tableau comparatif des paramètres utilisés pour les deux expériences.

- Concentration des anticorps de capture (anticorps spottés)

Deux concentrations d'anticorps de capture ont été testées pour l'IL6 et l'IL10. Les résultats sont présentés sur la Figure 25. Aucune comparaison ne peut se faire pour l'IL8 car la même concentration d'anticorps de capture a été utilisée pour toutes les expériences (450 µg/mL).



c

Paramètre	Courbes avant optimisation		Courbes après optimisation	
	IL6	IL10	IL6	IL10
a	1,50	1,17	$1,78 \times 10^8$	-1,6
b	2,52	2,91	-0,72	0,73
c	3754	3091	$4,0 \times 10^{13}$	31970
d	28,2	32	-0,14	80,7

d

	Concentration des anticorps de capture (anti-IL6 et anti-IL10)	Temps d'incubation	Matrice	Dilutions des anticorps biotylés	
				Anti-IL6	Anti-IL10
Avant optimisation	250 µg/mL	30 minutes	Urine humaine	1/500	1/250
Après optimisation	450 µg/mL	30 minutes	Urine humaine	1/1000	1/1000

Figure 25 : Concentrations des anticorps de capture

Comparaisons des courbes d'étalonnage (courbes ajustées) de l'IL6 (a) et l'IL10 (b) avec deux concentrations différentes d'anticorps de capture.

(c) Tableau des paramètres des courbes ajustées suivant l'équation : $y = d + (a-d) / (1,0 + (x/c)^b)$

(d) Tableau comparatif des paramètres utilisés pour les deux expériences.

Une véritable comparaison entre les deux concentrations d'anticorps spottés n'est pas possible car les autres paramètres ne sont pas tous identiques. Les anticorps de détection ont une concentration plus élevée pour la première expérience (avant optimisation).

Cependant, le temps d'incubation est identique et selon les résultats des gammes d'anticorps de détection (Annexe II), l'intensité de signal est similaire pour les différentes concentrations d'anticorps anti-IL6 utilisées dans les deux expériences. Il en est de même pour les concentrations d'anticorps anti-IL10. Ces concentrations devraient donc avoir

moins d'influence sur les intensités de signal obtenues que les concentrations en anticorps de capture.

Dans ce contexte, on remarque qu'une plus forte concentration d'anticorps de capture donne un signal maximal seulement légèrement plus élevé (en comparant les concentrations communes aux deux gammes et sachant que la gamme avant optimisation s'arrête à 25 000 pg/mL). Néanmoins, les courbes après optimisation donnent une meilleure limite de détection.

La concentration d'anticorps déposés de 450 µg/mL a été retenue pour toutes les autres expériences présentées dans cette partie.

2.4. Réaction croisée

La réaction croisée est la capacité d'un anticorps à réagir avec des antigènes différents. Lors de la réalisation des gammes d'interleukines, une seule interleukine est présente dans chaque puits. Il est donc possible de détecter d'éventuelles réactions croisées par rapport aux trois anticorps anti-interleukine spottés.

Concernant la gamme de l'IL8, on remarque que les spots correspondant aux anticorps anti-IL6 donnent un signal qui augmente avec la concentration en IL8 (Figure 26a). Cela montre que l'IL8 se fixe également sur les anticorps anti-IL6 spottés. La réaction croisée peut résulter d'un épitope en commun entre l'IL8 et l'IL6 ou de la reconnaissance d'un épitope ayant une structure similaire dans l'IL8 et l'IL6. Ce phénomène est atténué lorsque le temps d'incubation de l'IL8 et de l'anticorps anti-IL8 biotinylé est augmenté (Figure 26b). En effet, lors de la même expérience avec un temps d'incubation plus long, l'intensité de signal des spots d'anticorps anti-IL6 est diminuée d'un facteur 3.

Il n'a pas été observé de réaction croisée entre les autres interleukines et anticorps (Annexe III).

2.5. Interactions non-spécifiques

L'albumine de sérum bovin (BSA) est souvent utilisée comme agent bloquant pour saturer les sites non-spécifiques sur la surface de puces. Ici, les spots de BSA présents dans la matrice permettent de détecter certaines des liaisons non spécifiques des réactifs.

Dans plusieurs expériences n'utilisant pas les paramètres optimisés du test, on observe un signal sur les spots de BSA pour les puits de la gamme de l'IL10. Ce signal varie dans le même sens que la concentration en IL10 et est plus élevé que celui présent dans le puits du blanc de réaction (Figure 27).

On peut donc penser que le signal est une conséquence de la fixation de la protéine IL10 sur les spots de BSA. Ce phénomène est atténué voire disparaît pour les expériences

faites avec les paramètres optimisés. Les résultats concernant l'IL6 et l'IL8 ne montrent pas de signal différent du blanc sur les spots de BSA.

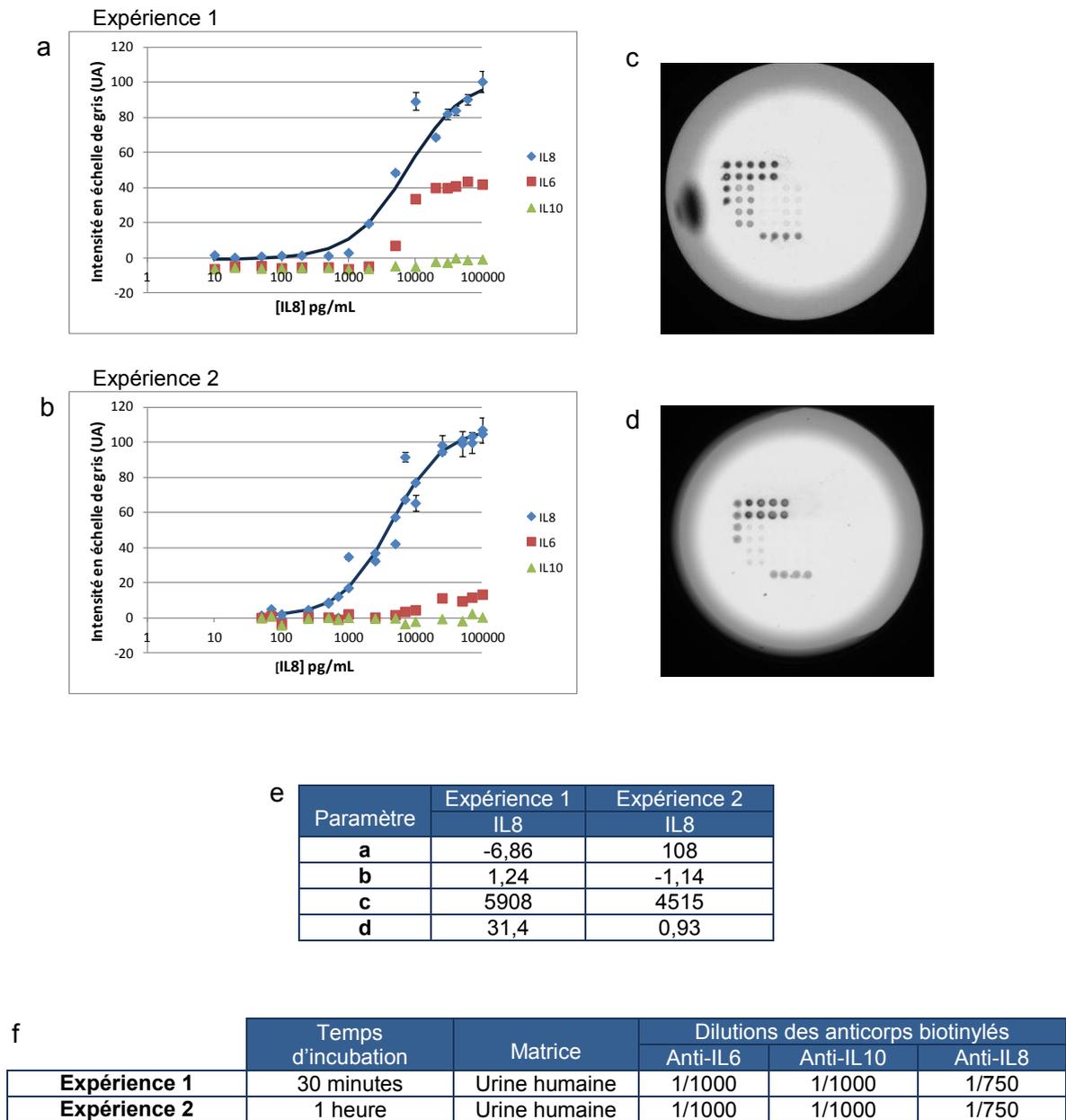


Figure 26 : Réaction croisée

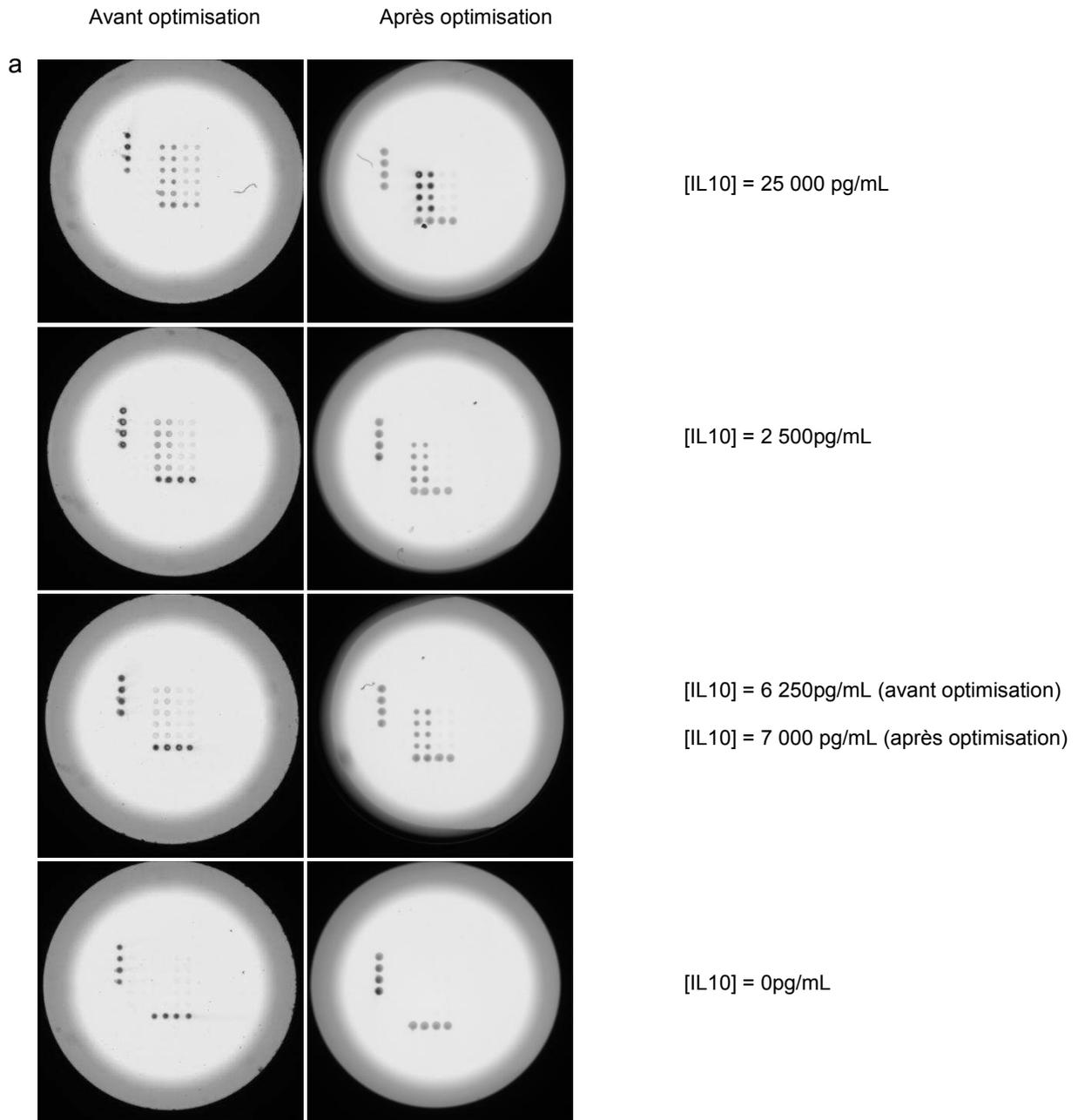
(a) et (b) Courbes d'étalonnage (courbes ajustées) de l'IL8 avec l'intensité de signal des spots correspondant aux anticorps de capture anti-IL6 et anti-IL10 pour deux expériences.

(c) et (d) Exemples d'images de puits de la gamme pour les deux expériences.

La concentration en IL8 dans chacun des puits est de 7000 pg/mL. Les spots sont disposés selon la matrice décrite dans la partie matériels et méthodes

(e) Tableau des paramètres des courbes ajustées suivant l'équation : $y = d + (a-d) / (1,0 + (x/c)^b)$

(f) Tableau comparatif des paramètres utilisés pour les deux expériences.



b

	Temps d'incubation	Matrice	Dilutions des anticorps biotinylés anti-IL10
Avant optimisation	30 minutes	Urine humaine	1/250
Après optimisation	1 heure	Urine humaine	1/1000

Figure 27 : Interactions non-spécifiques

(a) Images des puits de la gamme d'IL10 avant optimisation et après. Les spots sont disposés selon la matrice décrite dans la partie matériels et méthodes.

Les puits avec une concentration nulle d'IL10 contiennent seulement de l'urine humaine.

(b) Tableau comparatif des paramètres utilisés pour les deux expériences.

3. Discussion

La mise au point du test multiparamétrique pour la détection de l'IL6, l'IL10 et l'IL8 a nécessité plusieurs étapes d'optimisation. La limite de détection a notamment été améliorée par les modifications de concentrations d'anticorps de détection et du temps d'incubation des interleukines et des anticorps de détection ainsi que la concentration des anticorps de capture.

Les valeurs seuils qui seront utilisées dans le test multiparamétrique final ne sont pas encore définies mais les limites de détection des trois interleukines obtenues à ce stade sont trop élevées (déterminée visuellement, elle est d'environ 200 pg/mL pour l'IL6 et l'IL10 et entre 50 pg/mL et 100 pg/mL pour l'IL8). Il serait donc intéressant de continuer l'optimisation pour aboutir à une limite plus basse.

La limite de détection est considérée comme la plus petite quantité détectable. Une fois l'optimisation complète, cette limite devra être quantifiée par une analyse statistique de la différence d'intensité des signaux entre les échantillons et les contrôles négatifs.

Il faudra également déterminer les limites de quantification du test qui sont les plus petites quantités d'interleukines quantifiables avec une confiance acceptable et une incertitude connue. Ces deux critères font partie de la validation de la méthode avec d'autres paramètres à évaluer comme la répétabilité, la robustesse.

Lors de la mise au point du test, une réaction croisée a été observée pour l'IL8. Ce phénomène a pu être atténué avec l'augmentation du temps d'incubation. Par la suite, l'ajout d'autres biomarqueurs dans le test multiparamétrique pourra causer de nouvelles réactions croisées qui peuvent limiter le nombre de protéines détectées et quantifiées de manière multiplexe.

Le comportement et la détectabilité des trois interleukines dans un même échantillon n'ont pas encore été étudiés, chaque puits ne contenant pour l'instant qu'une seule interleukine. Il faudra donc faire cette étude pour se rapprocher des conditions réelles lors de l'analyse d'échantillons cliniques.

Le début de la mise au point du test multiparamétrique a également permis de soulever les difficultés du milieu utilisé. L'urine présente plusieurs avantages en analyse biomédicale : la collecte de l'échantillon est plus simple et non-invasive par rapport à un prélèvement sanguin. De plus, il est possible d'obtenir de plus grandes quantités. Cependant, l'urine est un milieu complexe contenant de nombreux minéraux et composés organiques tels que l'urée, la créatinine et l'acide urique. La détection par immunoanalyse de certains biomarqueurs peut s'avérer difficile car la sensibilité du test est potentiellement diminuée dans un tel milieu. Il est également possible que certains marqueurs ne soient présents dans l'urine qu'à de faibles concentrations ou que la

présence de substances interférentes empêche leur détection. Il faut également prendre en compte la labilité et la dégradation des marqueurs urinaires (106).

De plus, la composition et le pH de l'urine sont influencés par plusieurs facteurs comme le régime alimentaire et la prise de médicaments. La concentration en protéines diffère également selon le moment de prélèvement de l'échantillon urinaire et dépend de l'état d'hydratation du patient et de sa fonction rénale (106).

Il est donc nécessaire d'établir une standardisation des prélèvements urinaires. Il est conseillé d'avoir une valeur fiable de la diurèse ainsi que le dosage de la créatinine, permettant de valider la qualité du prélèvement urinaire. Le dosage pourra alors être exprimé en fonction du temps de recueil (85). Des recommandations pré-analytiques ont été publiées dans le cadre du projet « Protéomique des fluides biologiques et cancer » de l'INCa. Elles décrivent les conditions de prélèvements optimales, notamment le type de miction, le volume à recueillir et les contenants recommandés (107).

THESE SOUTENUE PAR : Marine De Paoli

TITRE : Développement d'un outil d'analyse de biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de la réponse au traitement médicamenteux du cancer de la vessie

CONCLUSION

En France, le cancer de la vessie est classé au 5^{ème} rang des cancers les plus fréquents. Ce type de cancer présente une forte tendance à la récurrence. Les tumeurs de la vessie non infiltrantes du muscle représentent 70 à 80% des cancers de la vessie et leur récurrence est estimée entre 50 et 70%, avec une infiltration du muscle dans 10 à 30% des cas. Cela implique une surveillance accrue des patients, qui peut être à vie selon le niveau de risque de récurrence et de progression.

Le suivi des récurrences se fait par cystoscopie et cytologie urinaire, qui sont aussi les examens de référence pour le diagnostic du cancer de la vessie. La cystoscopie est un geste invasif, douloureux pour certains patients et qui engendre un risque de 10% d'infection urinaire. Le besoin de suivi régulier a également un impact économique : le cancer de la vessie présente le coût le plus élevé de prise en charge par patient de tous les cancers.

Ainsi, il est important de trouver des alternatives aux protocoles de diagnostic et de suivi des patients. Dans ce contexte, les biomarqueurs urinaires semblent être de bons candidats. Ils peuvent également trouver leur place en médecine personnalisée en permettant d'identifier les patients les plus susceptibles de répondre à une chimiothérapie. Le projet européen DIPROMON a pour but de répondre à ces problématiques en développant un concept de stratification des patients grâce à leurs profils de biomarqueurs et leurs données cliniques. Pour cela, une plate-forme technologique est en cours de développement. Cette plate-forme inclut une puce à protéine sous la forme d'une plaque de microtitration de 96 puits permettant l'analyse multiparamétrique d'échantillons urinaires. La détection et la quantification de biomarqueurs se feront donc de façon automatisée et à haut-débit.

L'intérêt de cette plate-forme est d'étudier un ensemble de marqueurs pour définir un profil puisqu'aucun marqueur seul n'a une sensibilité et une spécificité suffisantes pour remplacer les « gold standards » du diagnostic et du suivi. De plus, ces profils de marqueurs permettront de mettre en place des règles de stratification pour une individualisation du traitement.

Les travaux présentés ici portent sur le début du projet DIPROMON avec la mise au point d'un test multiparamétrique de détection et de quantification de trois interleukines (IL6, IL8

et IL10) dans l'urine humaine. Les travaux ont principalement démontré la preuve de concept de ce test par immunoanalyse. Les premières étapes de l'optimisation de l'immunoessai ont ensuite permis l'amélioration de la limite de détection du test.

D'autres marqueurs urinaires seront ajoutés au test multiparamétrique à partir de la liste des marqueurs candidats établie par les partenaires du projet. L'outil devra ensuite être optimisé et validé par l'évaluation des performances du test selon plusieurs critères comme la sensibilité, la spécificité, la répétabilité et la robustesse. Après la validation analytique, il sera nécessaire de valider la plate-forme dans un contexte clinique. Pour cela, une étude clinique sera mise en place. Les résultats obtenus à partir d'échantillons cliniques seront comparés à ceux obtenus avec les méthodes de référence (la cystoscopie et la cytologie urinaire).

Enfin, le projet DIPROMON se porte sur le cancer de la vessie mais la plate-forme technologique et le concept de stratification ainsi développés pourront ensuite être appliqués en médecine personnalisée à d'autres cancers ou pathologies.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 18/11/2013

LE DOYEN


UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
DEPARTEMENT DE PHARMACIE
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
GRENOBLE

Professeur Christophe BUOT

LE PRESIDENT DE LA THESE


UFR Pharmacie
Département Mécanismes Biologiques
des Maladies et Traitements
Université Joseph Fourier
Grenoble

Professeur Michel SEVE

BIBLIOGRAPHIE

1. Hu Z-Z, Huang H, Wu CH, Jung M, Dritschilo A, Riegel AT, et al. Omics-Based Molecular Target and Biomarker Identification. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;719:547–71.
2. Sang-Hoon Cho JJ. Personalized medicine in breast cancer: a systematic review. *J Breast Cancer*. 2012;15(3):265–72.
3. Dipromon - University of Surrey - Guildford [Internet]. [consulté le 9 sept. 2013]. Disponible en ligne: <http://www.surrey.ac.uk/dipromon/>
4. HIFI Technology [Internet]. AXO Sci. [consulté le 22 mai 2013]. Disponible en ligne: <http://www.axoscience.com/technology/hifi-technology/>
5. HAS, INCa. Guide ALD Cancer de la vessie. 2010.
6. Francim, Hospices civils de Lyon, INCa, Inserm, InVs. Les données - Institut National Du cancer - Incidence et mortalité estimées des cancers en France métropolitaine en 2012 [Internet]. [consulté le 5 sept. 2013]. Disponible en ligne: <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-indicateurs/29-incidence-mortalite/38-ensemble-des-cancers/28-epidemiologie-des-cancers-en-france-metropolitaine-incidence/45-incidence-mortalite-estimees-cancers-france-metropolitaine-tous-sexes.html>
7. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin M. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. 2010 [consulté le 5 sept. 2013]. Disponible en ligne: <http://globocan.iarc.fr/>
8. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69–90.
9. Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol*. 2009 Jun;27(3):289–93.
10. Felix AS, Soliman AS, Khaled H, Zaghloul MS, Banerjee M, El-Baradie M, et al. The changing patterns of bladder cancer in Egypt over the past 26 years. *Cancer Causes Control CCC*. 2008 May;19(4):421–9.
11. Deneff JF - Université Catholique de Louvain - Faculté de Médecine. Le système urinaire [Internet]. [consulté le 9 sept. 2013]. Disponible en ligne: <http://www.isto.ucl.ac.be/safe/urinair4.htm>
12. NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines Bladder Cancer. 2013. Disponible en ligne : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site
13. InfoCancer. Les différents stades tumeurs de la vessie [Internet]. 2012 [consulté le 9 sept. 2013]. Disponible en ligne: <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/rein-et-voies-urinaires/cancer-vessie/formes-de-la-maladie/les-differents-stades.html>
14. Pfister C, Roupret M, Wallerand H, Davin J-L, Quintens H, Guy L, et al. Recommandations en Onco-Urologie 2010 : Tumeurs urothéliales. *Progrès En Urol*. 2010 Nov;20:S255–S274.

15. Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*. 2006 Mar;49(3):466–465; discussion 475–477.
16. EORTC. EORTC Risk Tables for Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer [Internet]. 2006 [consulté le 13 2013]. Disponible en ligne: <http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/>
17. Irani J, Bernardini S, Bonnal J-L, Chauvet B, Colombel M, Davin J-L, et al. Tumeurs urothéliales. Recommandations du CCAFU. *Progrès En Urol*. 2007;17:1065–98.
18. Sharma S, Ksheersagar P, Sharma P. Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am Fam Physician*. 2009 Oct 1;80(7):717–23.
19. Shariat SF, Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI. Critical Evaluation of Urinary Markers for Bladder Cancer Detection and Monitoring. *Rev Urol*. 2008;10(2):120–35.
20. Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J J Assoc Urol Can*. 2008 Jun;2(3):212–21.
21. Vordos D, Ploussard G. Cystoscopie en fluorescence pour les tumeurs superficielles de vessie : apport de l'hexaminolévinolate (Hexvix®) et du diagnostic photodynamique. *Progrès En Urol - FMC*. 2009 Mar;19(1):9–14.
22. Van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC. Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol*. 2009;16(1):23–30.
23. Van Der Aa MNM, Steyerberg EW, Sen EF, Zwarthoff EC, Kirkels WJ, Van Der Kwast TH, et al. Patients' perceived burden of cystoscopic and urinary surveillance of bladder cancer: a randomized comparison. *BJU Int*. 2008;101(9):1106–10.
24. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol*. 2011 Jun;59(6):997–1008.
25. InfoCancer. La chimiothérapie générale [Internet]. 2009 [consulté le 11 sept. 2013]. Available from: <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/rein-et-voies-urinaires/cancer-vessie/traitements/la-chimiotherapie-generale.html>
26. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol*. 2009 Jun;27(3):295–300.
27. European Commission Health Research Directorate. Research perspectives - biomarkers for patient stratification [Internet]. 2012 [consulté le 8 mars 2013]. Disponible en ligne: http://ec.europa.eu/research/health/pdf/biomarkers-for-patient-stratification_en.pdf
28. Kinders R, Jones T, Root R, Bruce C, Murchison H, Corey M, et al. Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin Cancer Res*. 1998 Oct 1;4(10):2511–20.

29. Campos-fernandes J-L, Descotes F, Andre J, Perrin P, Devonec M, Ruffion A. Intérêt des marqueurs urinaires dans le diagnostic et le suivi des tumeurs urothéliales de vessie. *Progrès En Urol.* 2007 février;17(1):23–34.
30. Cheng Z-Z, Corey MJ, Pärevalo M, Majno S, Hellwage J, Zipfel PF, et al. Complement Factor H as a Marker for Detection of Bladder Cancer. *Clin Chem.* 2005 May 1;51(5):856–63.
31. Vrooman OPJ, Witjes JA. Urinary Markers in Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2008 May;53(5):909–16.
32. Konety BR, Nguyen T-ST, Dhir R, Day RS, Becich MJ, Stadler WM, et al. Detection of Bladder Cancer Using a Novel Nuclear Matrix Protein, BLCA-4. *Clin Cancer Res.* 2000 Jul 1;6(7):2618–25.
33. Van Le T-S, Miller R, Barder T, Babjuk M, Potter DM, Getzenberg RH. Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology.* 2005 Dec;66(6):1256–60.
34. Seripa D, Parrella P, Gallucci M, Gravina C, Papa S, Fortunato P, et al. Sensitive detection of transitional cell carcinoma of the bladder by microsatellite analysis of cells exfoliated in urine. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2001 Nov 20;95(6):364–9.
35. Parker J, Spiess PE. Current and Emerging Bladder Cancer Urinary Biomarkers. *Sci World J.* 2011;11:1103–12.
36. Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, Mishina M, Itoh N, Yamada H, et al. Detection of Telomerase Activity in Exfoliated Cells in Urine From Patients With Bladder Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997 May 21;89(10):724–30.
37. Hou M, Xu D, Björkholm M, Gruber A. Real-Time Quantitative Telomeric Repeat Amplification Protocol Assay for the Detection of Telomerase Activity. *Clin Chem.* 2001 Mar 1;47(3):519–24.
38. Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PMM, Kurth KH. Tumor Markers in the Diagnosis of Primary Bladder Cancer. A Systematic Review. *J Urol.* 2003 Jun;169(6):1975–82.
39. Fernandez-Gomez J, Rodríguez-Martínez JJ, Barmadah SE, García Rodríguez J, Allende DM, Jalon A, et al. Urinary CYFRA 21.1 is not a useful marker for the detection of recurrences in the follow-up of superficial bladder cancer. *Eur Urol.* 2007 May;51(5):1267–74.
40. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan RC, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol.* 2000 Jan;163(1):348–56.
41. Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Lokeshwar BL. HYAL1 Hyaluronidase: A Molecular Determinant of Bladder Tumor Growth and Invasion. *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2243.
42. Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer.* 2007;109(6):1106–13.

43. Moussa O, Abol-Enein H, Bissada NK, Keane T, Ghoneim MA, Watson DK. Evaluation of survivin reverse transcriptase-polymerase chain reaction for noninvasive detection of bladder cancer. *J Urol*. 2006 Jun;175(6):2312–6.
44. Shariat SF, Casella R, Khoddami SM, Hernandez G, Sulser T, Gasser TC, et al. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer. *J Urol*. 2004 Feb;171(2 Pt 1):626–30.
45. Diamandis EP. How Are We Going to Discover New Cancer Biomarkers? A Proteomic Approach for Bladder Cancer. *Clin Chem*. 2004 May 1;50(5):793–5.
46. Hamburg MA, Collins FS. The path to personalized medicine. *N Engl J Med*. 2010 Jul 22;363(4):301–4.
47. Compton C. Getting to personalized cancer medicine. *Cancer*. 2007;110(8):1641–3.
48. Diamandis M, White NMA, Yousef GM. Personalized Medicine: Marking a New Epoch in Cancer Patient Management. *Mol Cancer Res*. 2010 Sep 1;8(9):1175–87.
49. Ramachandran N, Srivastava S, LaBaer J. Applications of protein microarrays for biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl*. 2008 Oct;2(10-11):1444–59.
50. Ahram M, Petricoin EF. Proteomics Discovery of Disease Biomarkers. *Biomark Insights*. 2008 Jun 6;3:325–33.
51. Liotta LA, Petricoin EF. Putting the “Bio” back into Biomarkers: Orienting Proteomic Discovery toward Biology and away from the Measurement Platform. *Clin Chem*. 2008 Jan 1;54(1):3–5.
52. Reddy G, Dalmaso EA. SELDI ProteinChip® Array Technology: Protein-Based Predictive Medicine and Drug Discovery Applications. *J Biomed Biotechnol*. 2003 Oct 29;2003(4):237–41.
53. Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, et al. Development of a Novel Proteomic Approach for the Detection of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder in Urine. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1491–502.
54. Yu X, Schneiderhan-Marra N, Joos TO. Protein Microarrays for Personalized Medicine. *Clin Chem*. 2010 Mar 1;56(3):376–87.
55. Ideker T, Galitski T, Hood L. A new approach to decoding life: Systems Biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001;2(1):343–72.
56. Regenmortel MHVV. Reductionism and complexity in molecular biology. *EMBO Rep*. 2004 Nov;5(11):1016–20.
57. Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 Oct;5(10):588–99.
58. Brenner DE, Normolle DP. Biomarkers for Cancer Risk, Early Detection, and Prognosis: The Validation Conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Oct 1;16(10):1918–20.

59. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, et al. Tumor Marker Utility Grading System: a Framework to Evaluate Clinical Utility of Tumor Markers. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Oct 16;88(20):1456–66.
60. Diamandis EP. *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications.* Amer. Assoc. for Clinical Chemistry; 2002.
61. Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Mar 20;23(9):2020–7.
62. Freidlin B, McShane LM, Korn EL. Randomized Clinical Trials With Biomarkers: Design Issues. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2010 Feb 3;102(3):152–60.
63. Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, De Marzo AM, Hammond ME, Hayes DF, et al. NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN.* 2011 Nov;9 Suppl 5:S1–32; quiz S33.
64. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of Archived Specimens in Evaluation of Prognostic and Predictive Biomarkers. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2009 Nov 4;101(21):1446–52.
65. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 Apr 1;26(10):1626–34.
66. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O’Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(17):1757–65.
67. Hartmann M, Roeraade J, Stoll D, Templin MF, Joos TO. Protein microarrays for diagnostic assays. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Mar;393(5):1407–16.
68. Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Antibody-Based Protein Multiplex Platforms: Technical and Operational Challenges. *Clin Chem.* 2010 Feb 1;56(2):186–93.
69. Liotta LA, Espina V, Mehta AI, Calvert V, Rosenblatt K, Geho D, et al. Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell.* 2003 Apr;3(4):317–25.
70. Zhu H, Snyder M. Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol.* 2003 février;7(1):55–63.
71. Mortuaire G, Marchetti P, Formstecher P, Danzé P-M. Nouvelle approche globale en protéomique: les biopuces à protéines. *Techniques actuelles et applications. Ann Biol Clin (Paris).* 2004 Mar 1;62(2):139–48.
72. Kersten B, Wanker EE, Hoheisel JD, Angenendt P. Multiplex approaches in protein microarray technology. *Expert Rev Proteomics.* 2005 Aug;2(4):499–510.
73. Schweitzer B, Predki P, Snyder M. Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale. *PROTEOMICS.* 2003;3(11):2190–9.

74. Michaud GA, Salcius M, Zhou F, Bangham R, Bonin J, Guo H, et al. Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol.* 2003 Dec;21(12):1509–12.
75. Espina V, Mehta AI, Winters ME, Calvert V, Wulfschlegel J, Petricoin EF 3rd, et al. Protein microarrays: molecular profiling technologies for clinical specimens. *Proteomics.* 2003 Nov;3(11):2091–100.
76. Haab BB. Antibody Arrays in Cancer Research. *Mol Cell Proteomics.* 2005 Apr 1;4(4):377–83.
77. MacBeath G. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet.* 2002 Dec;32 Suppl:526–32.
78. Sheehan KM, Calvert VS, Kay EW, Lu Y, Fishman D, Espina V, et al. Use of Reverse Phase Protein Microarrays and Reference Standard Development for Molecular Network Analysis of Metastatic Ovarian Carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2005 Apr 1;4(4):346–55.
79. xMAP Technology Multiplexing for Bioassays - Luminex Corporation [Internet]. [consulté le 25 sept. 2013]. Disponible en ligne: <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/>
80. Shenkenberg D. System can detect 9600 proteins or DNA molecules simultaneously [Internet]. *Photonics.com.* 2008 [consulté le 25 sept. 2013]. Disponible en ligne: <http://www.photonics.com/WA36055>
81. YSL Bioprocess Development Co. AimPlex Multiplex Immunoassay for Flow - How It Works [Internet]. YSL Bioprocess Dev. Co. [consulté le 25 sept. 2013]. Disponible en ligne: <http://www.yslbio.com/products>
82. Glökler J, Angenendt P. Protein and antibody microarray technology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 Nov 25;797(1-2):229–40.
83. Haab BB. Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. *Proteomics.* 2003;3(11):2116–22.
84. Angenendt P. Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discov Today.* 2005 Apr 1;10(7):503–11.
85. Massart C. *Immunoanalyse: De la théorie aux critères de choix en biologie clinique.* EDP Sciences; 2012.
86. Kingsmore SF. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Apr;5(4):310–20.
87. Schweitzer B, Roberts S, Grimwade B, Shao W, Wang M, Fu Q, et al. Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. *Nat Biotechnol.* 2002 Apr;20(4):359–65.
88. Schweitzer B, Wiltshire S, Lambert J, O'Malley S, Kukanskis K, Zhu Z, et al. Immunoassays with rolling circle DNA amplification: A versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 29;97(18):10113–9.

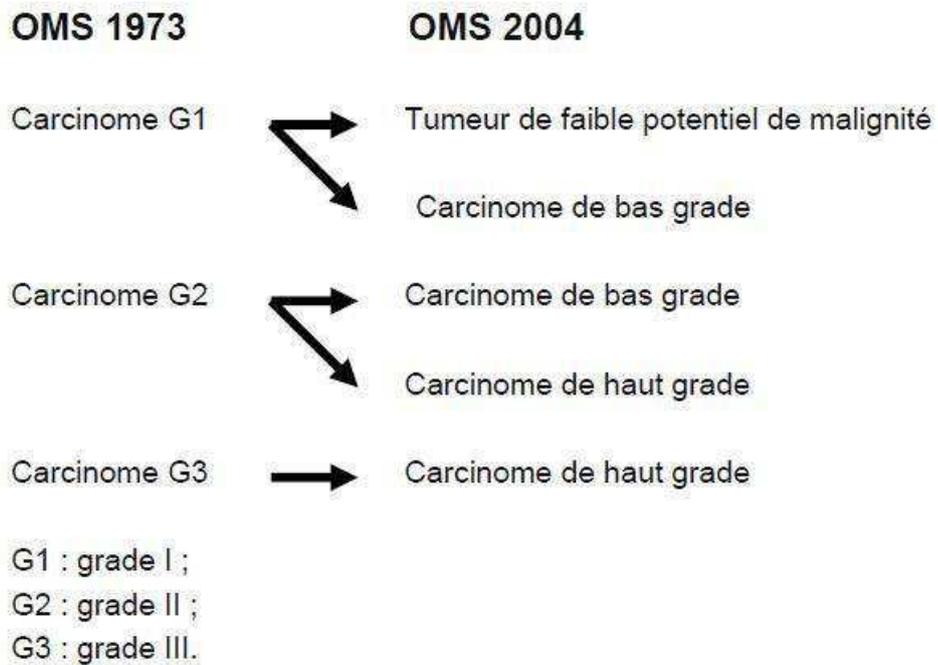
89. Koga H, Kyo M, Usui-Aoki K, Inamori K. A chip-based miniaturized format for protein-expression profiling: The exploitation of comprehensively produced antibodies. *ELECTROPHORESIS*. 2006;27(18):3676–83.
90. Yu X, Xu D, Cheng Q. Label-free detection methods for protein microarrays. *PROTEOMICS*. 2006;6(20):5493–503.
91. Usui-Aoki K, Shimada K, Nagano M, Kawai M, Koga H. A novel approach to protein expression profiling using antibody microarrays combined with surface plasmon resonance technology. *PROTEOMICS*. 2005;5(9):2396–401.
92. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*. 2001 Sep 14;293(5537):2101–5.
93. Houseman BT, Huh JH, Kron SJ, Mrksich M. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat Biotechnol*. 2002 Mar;20(3):270–4.
94. Wulfkühle JD, Speer R, Pierobon M, Laird J, Espina V, Deng J, et al. Multiplexed cell signaling analysis of human breast cancer applications for personalized therapy. *J Proteome Res*. 2008 Apr;7(4):1508–17.
95. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2002 Mar;16(3):414–6.
96. Sturgeon CM, Hoffman BR, Chan DW, Ch'ng S-L, Hammond E, Hayes DF, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Clinical Practice: Quality Requirements. *Clin Chem*. 2008 Aug 1;54(8):e1–e10.
97. Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Measurement and Quality Control Issues in Multiplex Protein Assays: A Case Study. *Clin Chem*. 2009 Jun 1;55(6):1092–9.
98. Kricka LJ, Master SR. Quality Control and Protein Microarrays. *Clin Chem*. 2009 Jun 1;55(6):1053–5.
99. Hamelinck D, Zhou H, Li L, Verweij C, Dillon D, Feng Z, et al. Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2005 Jun;4(6):773–84.
100. Shi L. Executive summary: the MicroArray Quality Control (MAQC) project: toward consensus on “Best Practices” for the generation, analysis, and application of microarray data in the discovery, development, and review of FDA-regulated products. [Internet]. 2006 [consulté le 4 oct. 2013]. Disponible en ligne: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/BioinformaticsTools/MicroarrayQualityControlProject/UCM132150.pdf>
101. Chen M-F, Lin P-Y, Wu C-F, Chen W-C, Wu C-T. IL-6 Expression Regulates Tumorigenicity and Correlates with Prognosis in Bladder Cancer. *PLoS One*. 2013 Apr 30;8(4).
102. Urquidi V, Chang M, Dai Y, Kim J, Wolfson ED, Goodison S, et al. IL-8 as a urinary biomarker for the detection of bladder cancer. *BMC Urol*. 2012 May 4;12(1):12.

103. Luo Y, Askeland EJ, Newton MR, O'Donnell MA. Role of IL-10 in Urinary Bladder Carcinoma and Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy. *Am J Immunol*. 2012 Jan 1;8(1):1–9.
104. Corgier BP, Mandon CA, Le Goff GC, Blum LJ, Marquette CA. Adhesive microarrays for multipurpose diagnostic tools. *Lab Chip*. 2011 Sep 7;11(17):3006–10.
105. Buchegger P, Sauer U, Toth-Szekely H, Preininger C. Miniaturized Protein Microarray with Internal Calibration as Point-of-Care Device for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Sensors*. 2012 Feb 3;12(2):1494–508.
106. Fredolini C, Meani F, Reeder KA, Rucker S, Patanarut A, Botterell PJ, et al. Concentration and Preservation of Very Low Abundance Biomarkers in Urine, such as Human Growth Hormone (hGH), by Cibacron Blue F3G-A Loaded Hydrogel Particles. *Nano Res*. 2008 Dec;1(6):502–18.
107. Lehmann S, Roche S, Allory Y, Barthelaix A, Beaudeau J-L, Berger F, et al. Preanalytical guidelines for clinical proteomics investigation of biological fluids. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2009 Dec;67(6):629–39.

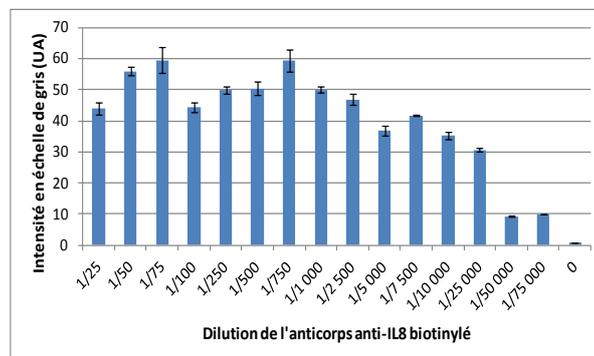
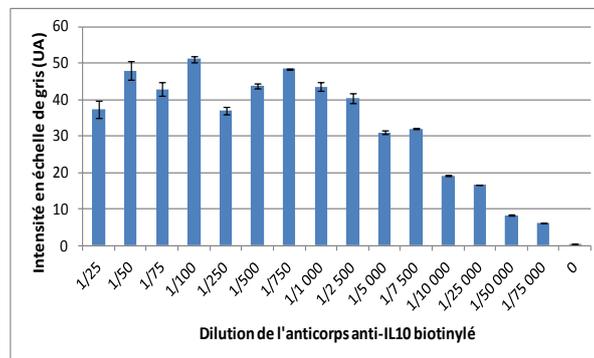
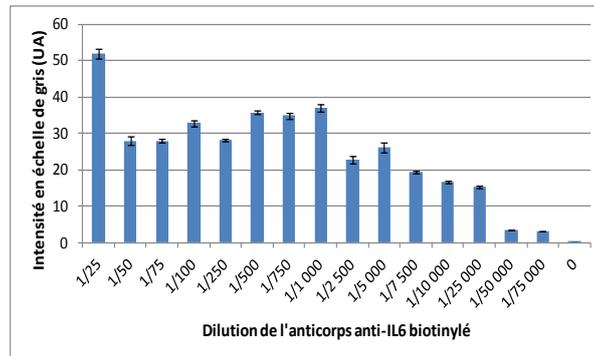
ANNEXES

Annexe I : Grades histologiques des tumeurs urothéliales

La référence actuelle des tumeurs urothéliales est la classification OMS 2004, mais de nombreux urologues et pathologistes utilisent la classification OMS 1973 (5).



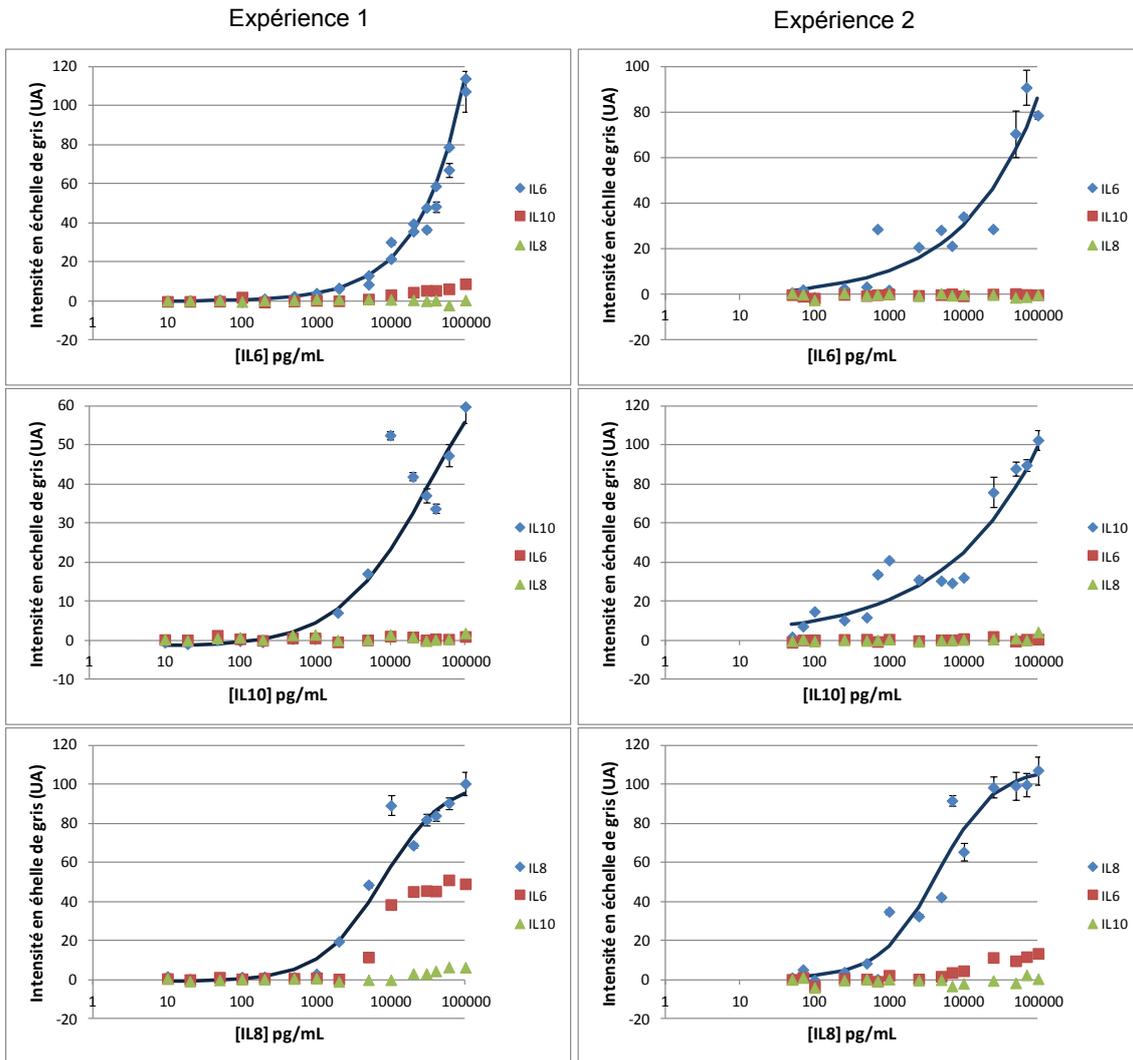
Annexe II : Gammes d'anticorps de détection



La concentration initiale pour les trois anticorps est de 500 µg/mL. Les dilutions sont faites dans le LowCross Buffer.

Chaque interleukine a une concentration fixe de 10 000 pg/mL. Les interleukines sont diluées dans l'urine humaine.

Annexe III : Réaction croisée



Courbes d'étalonnage (courbes ajustées) de l'IL6, IL8, et IL10 avec l'intensité de signal des spots correspondant aux autres anticorps de capture pour deux expériences.

Tableau des paramètres des courbes ajustées suivant l'équation : $y = d + (a-d) / (1,0 + (x/c)^b)$

Paramètre	Expérience 1			Expérience 2		
	IL6	IL10	IL8	IL6	IL10	IL8
a	$1,78 \times 10^8$	-1,6	-6,86	$13,2 \times 10^5$	$71,4 \times 10^5$	108
b	-0,72	0,73	1,24	-0,44	-0,35	-1,14
c	$4,0 \times 10^{13}$	31970	5908	$3,15 \times 10^{14}$	$7,8 \times 10^{18}$	4515
d	-0,14	80,7	31,4	-1,2	1,1	0,93



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

THESE SOUTENUE PAR : Marine DE PAOLI

TITRE : Développement d'un outil d'analyse de biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de la réponse au traitement médicamenteux du cancer de la vessie

RESUME

Les avancées technologiques, notamment dans le domaine de la protéomique, ont permis d'améliorer la compréhension des aspects physiopathologiques de certaines maladies mais également de découvrir de nouveaux biomarqueurs. Ces derniers ont un fort potentiel au regard de la médecine personnalisée, que ce soit à l'étape de diagnostic, de traitement ou de suivi.

Dans ce contexte, le projet DIPROMON a pour objectif d'améliorer les stratégies de médecine personnalisée dans le cancer de la vessie. Pour cela, un concept de stratification des patients sera élaboré grâce à l'analyse de profils de biomarqueurs. La stratification sera notamment utile pour la surveillance des récurrences du cancer de la vessie et pour le choix de la thérapie selon la prédiction de réponse au traitement.

Même si la majorité des patients est atteinte de tumeurs superficielles (n'infiltrant pas le muscle), le taux de récurrence est élevé et concerne entre 50 et 70% des patients. La surveillance régulière des patients atteints de cancer de la vessie en est une des conséquences principales.

Les travaux présentés dans ce mémoire concernent la mise au point d'un test multiparamétrique haut-débit pour la détection et la quantification des biomarqueurs, qui fera partie de la plate-forme technologique élaborée dans le projet DIPROMON. Le développement de la puce à protéines a débuté avec trois interleukines (IL6, IL8 et IL10) qui sont détectées et quantifiées par une méthode d'immunoessai en sandwich. Le test a subi plusieurs étapes d'optimisation mais la validation analytique n'est pas encore complète.

L'outil d'analyse final se complexifiera lors de l'ajout d'autres marqueurs sélectionnés par les partenaires du projet. Il nécessitera ensuite une validation clinique, notamment par une étude pilote.

Mots clés : cancer de la vessie, biomarqueurs, puce à protéines, test multiparamétrique, échantillons urinaires, immunoessai, interleukines

Adresses :

16 rue Renoir 38320 Eybens

marine.depaoli@gmail.com