



HAL
open science

Cancer de la vessie: sélection de biomarqueurs urinaires et développement d'un outil d'analyse multiparamétrique pour le diagnostic et la récurrence des tumeurs urothéliales

Marine De Paoli

► To cite this version:

Marine De Paoli. Cancer de la vessie: sélection de biomarqueurs urinaires et développement d'un outil d'analyse multiparamétrique pour le diagnostic et la récurrence des tumeurs urothéliales. Ingénierie biomédicale. Université de Lyon, 2016. Français. NNT: 2016LYSE1158 . tel-01412730

HAL Id: tel-01412730

<https://theses.hal.science/tel-01412730>

Submitted on 8 Dec 2016

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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1158

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale 205
École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biotechnologies

Soutenue publiquement le 13 septembre 2016 par

Marine DE PAOLI

Cancer de la vessie : Sélection de biomarqueurs urinaires et développement d'un outil d'analyse multiparamétrique pour le diagnostic et la récidive des tumeurs urothéliales

Devant le jury composé de :

Loïc BLUM
Patrice MARCHE
François RADVANYI
Wilfrid BOIREAU
Anne-Sophie GAUCHEZ
Christophe MARQUETTE

Professeur – ICBMS, Université Lyon 1
Directeur de Recherche – IAB, Grenoble
Directeur de Recherche – Institut Curie, Paris
Chargé de Recherche – FEMTO-ST, Besançon
Docteur, biologiste – INSERM, CHU, Grenoble
Directeur de Recherche – ICBMS, Lyon

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

École Supérieure de Chimie Physique Électronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

École Supérieure du Professorat et de l'Éducation

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



L'ensemble des travaux constituant cette thèse a été réalisé :

Au sein de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS à l'Université Claude Bernard Lyon 1, sous la direction du Dr Christophe Marquette ainsi qu'au sein de l'entreprise AXO Science dirigée par M. Othello Chartier dans le cadre d'une convention CIFRE

**Équipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires**

UMR 5246 Université Lyon 1 / CNRS

Bâtiment CPE

43 Boulevard du 11 Novembre 1918

69622 Villeurbanne Cedex - France



AXO Science SAS

66 Boulevard Niels Bohr

69100 Villeurbanne - France



AXO Science

À l'aide du financement du projet européen FP7 DIPROMON



DIPROMON

Au sein de l'École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé



REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements au Dr. Patrice Marche, au Dr. François Radvanyi ainsi qu'au Dr. Wilfrid Boireau qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour avoir consacré du temps à l'analyse et la critique de ce travail.

Je remercie également le Dr. Anne-Sophie Gauchez pour avoir accepté de faire partie du jury et pour l'examen de cette thèse.

Je remercie le Pr. Loïc Blum pour avoir présidé ce jury et pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Dr. Christophe Marquette, pour son encadrement et son soutien durant ces trois années de thèse.

Je remercie le Dr. Jean Breton et le Dr. Sébastien Violot pour leurs conseils et leur participation à mon comité de suivi de thèse.

Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe GEMBAS et mes collègues d'AXO Science pour tous les bons moments partagés.

Je remercie aussi l'ensemble des membres du projet européen DIPROMON.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leur présence et leur soutien au quotidien et sans qui je n'en serai pas arrivée là.

ABRÉVIATIONS

ACE	antigène carcino-embryonnaire (ou CEA, <i>carcinoembryonic antigen</i>)
ADN	acide désoxyribonucléique
AFM	microscopie à force atomique (<i>atomic force microscopy</i>)
AHRQ	<i>Agency for Healthcare Research and Quality</i>
AIT	<i>Austrian Institute of Technology</i>
ARN	acide ribonucléique
ASR	taux standardisé sur l'âge (<i>age-standardized rate</i>)
AUC	aire sous la courbe ROC (<i>area under the ROC curve</i>)
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BTA	<i>bladder tumor antigen</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCD	dispositif à transfert de charge (<i>charged-coupled device</i>)
CEE	Communauté Économique Européenne
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CIS	carcinome <i>in situ</i>
COFRAC	Comité français d'accréditation
CPC	carcinome à petites cellules
CPTAC	<i>Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium</i>
DIPROMON	<i>Multimodular biomarker analysis workflow for Dagnosis, PROgnosis and MONitoring of drug treatment response in bladder cancer</i>
EGF	facteur de croissance épidermique (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMA	Agence européenne des médicaments (<i>European Medicines Agency</i>)
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
EVCI	espérance de vie corrigée de l'incapacité
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
HA	acide hyaluronique

HAase	hyaluronidase
HAS	Haute Autorité de Santé
hCFHrp	<i>human complement factor H-related protein</i>
HRP	peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxidase</i>)
IAP	<i>inhibitors of apoptosis proteins</i>
IC	intervalle de confiance
ICBT	combinaison itérative de biomarqueurs et de seuils (<i>iterative combination of biomarkers and thresholds</i>)
IEBA	<i>in-situ encoded bead-based array</i>
IgE	immunoglobuline de type E
IgG	immunoglobuline de type G
INCa	Institut National du Cancer
IPOP	instillation postopératoire précoce
IRMA	dosage immunoradiométrique (<i>immunoradiometric assay</i>)
LASSO	<i>Least Absolute Shrinkage and Selection Operator</i>
LMP	tumeur à faible potentiel de malignité (<i>low malignancy potential</i>)
LOOCV	<i>leave-one-out cross-validation</i>
MALDI-TOF-MS	spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par matrice et un analyseur à temps de vol (<i>matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>)
MAQC	<i>Microarray Quality Control Project</i>
NACB	<i>National Academy of Clinical Biochemistry</i>
NBT	bleu de nitrotétrazolium (<i>nitroblue tetrazolium</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NMP22	<i>nuclear matrix protein 22</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	phosphatase alcaline
PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	réaction en chaîne par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PLA	essai de ligature de proximité, <i>proximity ligation assay</i>

PMA	<i>pre-market approval</i>
PSA	antigène prostatique spécifique (<i>prostate-specific antigen</i>)
POC	test biologique délocalisé (<i>point-of-care</i>)
RCA	<i>rolling circle amplification</i>
REMARK	<i>Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies</i>
ROC	fonction d'efficacité du récepteur (<i>receiver operating characteristic</i>)
RT-PCR	transcription réverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RTUV	résection transurétrale de la vessie
SELDI	<i>surface-enhanced laser desorption ionization</i>
SELDI-TOF-MS	spectrométrie de masse à temps de vol d'ions désorbés de la surface par laser (<i>surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>)
SPR	résonance plasmonique de surface (<i>surface plasmon resonance</i>)
SPRi	résonance plasmonique de surface par imagerie (<i>SPR imaging</i>)
TDM	tomodensitométrie
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TMUGS	<i>Tumor Marker Utility Grading System</i>
TNM	<i>Tumor Nodes Metastasis</i>
TrEMBL	<i>Translated EMBL Nucleotide Sequence Data Library</i>
UBC	<i>Urinary Bladder Cancer</i>
TRAP	<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>
TVIM	tumeur de vessie avec infiltration musculaire
TVNIM	tumeur de vessie non infiltrante du muscle
u.a.	unité arbitraire
UE	Union Européenne
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	7
ABRÉVIATIONS.....	9
SOMMAIRE	13
LISTE DES FIGURES.....	17
LISTE DES TABLEAUX	19
INTRODUCTION.....	21
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	25
Chapitre 1. Les puces à protéines.....	27
1. Introduction.....	29
1.1. Des puces à ADN aux puces à protéines	29
1.2. La théorie de l'analyte ambiant.....	29
1.3. Conception de puces à protéines	31
2. Types de puces à protéines	32
2.1. Puces à protéines fonctionnelles.....	32
2.2. Puces à protéines analytiques	33
3. Méthodes de détection	39
3.1. Détection avec marquage	39
3.2. Détection sans marquage.....	45
4. Applications	47
4.1. Recherche protéomique.....	48
4.2. Diagnostic <i>in vitro</i>	49
5. Problématiques de contrôle qualité et d'analyse de données des puces à protéines	51
Chapitre 2. Les plateformes d'immunoessais	53
1. La plateforme idéale.....	55
1.1. Caractéristiques analytiques	55
1.2. Multiplexage.....	56
1.3. Flexibilité et haut-débit	56
1.4. Caractéristiques de l'instrument	58
2. Validation des immunoessais en multiplexe	59
2.1. Perspective de l'industrie pharmaceutique	59
2.2. Recommandations européennes et françaises	61
2.3. Recommandations pour la validation d'immunoessais pour biomarqueurs	62
2.4. La réaction croisée, un obstacle au multiplexage	66

3.	Exemples de plateformes	69
3.1.	Plateformes en format en suspension	69
3.2.	Plateformes en format planaire	72
Chapitre 3.	Le cancer de la vessie	77
1.	Épidémiologie.....	79
2.	Classifications des tumeurs de la vessie.....	81
2.1.	Classification histologique	82
2.2.	Classification clinique	82
2.3.	Grade cellulaire	84
2.4.	Rôle de la classification des tumeurs dans le pronostic de la récurrence et de la progression du cancer de la vessie.....	85
3.	Diagnostic	86
4.	Prise en charge thérapeutique	87
4.1.	Traitement des TVNIM (Ta, T1 et CIS)	87
4.2.	Traitement des TVIM non métastatiques.....	88
4.3.	Traitement des cancers métastatiques	89
5.	Surveillance	89
6.	Besoins d'optimisation de la prise en charge.....	91
Chapitre 4.	Les biomarqueurs	93
1.	Introduction.....	95
2.	Processus de découverte et d'identification des biomarqueurs.....	96
2.1.	Les différentes approches pour la découverte de nouveaux biomarqueurs	96
2.2.	Le rôle de la bioinformatique	97
2.3.	Technologies de protéomique.....	97
3.	Validation de nouveaux biomarqueurs et transposition à la clinique	100
3.1.	Validation clinique.....	101
3.2.	Validation réglementaire.....	102
4.	Les biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie.....	104
4.1.	BTA-TRAK™ et BTA-stat™	104
4.2.	NMP22	104
4.3.	ImmunoCyt™	105
4.4.	BLCA-4	105
4.5.	Cytokératines.....	106
4.6.	HA-HAase.....	107
4.7.	Survivine	108
4.8.	Antigène Lewis X.....	109

4.9.	Marqueurs non protéiques	109
4.10.	Résumé des caractéristiques et des performances des biomarqueurs	111
Chapitre 5.	Le projet européen DIPROMON	115
1.	Description du projet.....	117
2.	Le rôle d'AXO Science.....	119
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....		121
Chapitre 6.	Matériels	123
1.	Réactifs	125
1.1.	Cibles	125
1.2.	Anticorps	125
1.3.	Autres réactifs	126
2.	Supports	127
3.	Trousses ELISA	127
4.	Instruments	128
5.	Logiciels	128
Chapitre 7.	Méthodes	129
1.	Immunoessais classiques.....	131
1.1.	Préparation des échantillons.....	131
1.2.	Principe général.....	131
1.3.	Génération et analyse des signaux.....	133
2.	Immunoessais multiparamétriques.....	133
2.1.	Préparation des puces	134
2.2.	Protocoles des immunoessais	135
2.3.	Génération et analyse des signaux.....	136
RÉSULTATS ET DISCUSSION		139
Chapitre 8.	Sélection de biomarqueurs urinaires pour le diagnostic et la récurrence des tumeurs urothéliales	143
1.	Étude pilote	145
1.1.	Identification des marqueurs à évaluer	146
1.2.	Première évaluation	146
1.3.	Seconde évaluation	148
1.4.	Conclusion	152
2.	Seconde étude.....	155
2.1.	Conception de l'étude	155
2.2.	Dosage des marqueurs.....	157
2.3.	Évaluation des performances.....	158

2.4. Conclusion	161
Chapitre 9. Développement d'une plateforme d'immunoessais pour la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie	163
1. Introduction.....	165
1.1. Preuve de concept.....	165
1.2. Vue d'ensemble du développement des immunoessais multiparamétriques.....	166
2. Développement du Panel 1	167
2.1. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9 et IL8	167
2.2. Intégration du marqueur EGFR	170
2.3. Intégration du marqueur PTGS2.....	172
2.4. Cas particulier du marqueur EN2	176
3. Modification de support.....	177
4. Développement du Panel 1 avec le nouveau support	179
4.1. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9 et IL8	179
4.2. Intégration du marqueur PTGS2.....	181
4.3. Conclusion	182
5. Développement du Panel 2	183
5.1. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9, IL8 et IL6	183
5.2. Intégration des marqueurs CDH1 et ErbB2	193
5.3. Conclusion	199
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	201
RÉFÉRENCES.....	205

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1. Signal et densité de signal de micro-plots à différentes concentrations de molécule de capture	30
Figure 1-2. Étapes de la conception d'une puce à protéines	32
Figure 1-3. Types de puces à protéines	34
Figure 1-4. Formats de puces à protéines analytiques	34
Figure 1-5. Stratégies d'immunoessais multiparamétriques	35
Figure 1-6. Les formats planaires en phase directe et phase inverse	36
Figure 1-7. Principe du format en suspension.....	37
Figure 1-8. Puce à protéines AYOXXA	38
Figure 1-9. Immunoessai avec amplification de signal par RCA.....	40
Figure 1-10. Principales réactions de chimiluminescence utilisées en chimie analytique.....	41
Figure 1-11. Puce à protéines en double format.....	42
Figure 1-12. Puce à protéine pour le diagnostic de l'allergie.....	43
Figure 1-13. Stratégie de double détection colorimétrique par deux enzymes différentes.....	44
Figure 1-14. Puce ImmunoCAP ISAC® pour le diagnostic de l'allergie	50
Figure 2-1. Représentation schématique d'un système automatisé d'immunoessais	57
Figure 2-2. Représentation schématique des étapes de validation d'un immunoessai	60
Figure 2-3. Scénarios de réaction croisée d'un immunoessai multiparamétrique et en format sandwich.....	67
Figure 2-4. Concept de colocalisation d'anticorps	69
Figure 2-5. Principe de la technologie VeraCode™	71
Figure 2-6. Principe de la technologie MULTI-ARRAY	73
Figure 2-7. Principe de la technologie Simoa™	75
Figure 3-1. Représentation géographique du taux d'incidence du cancer de la vessie estimé et normalisé selon l'âge, pour 100 000 personnes, tout sexe et âge confondus.....	79
Figure 3-2. Taux d'incidence (bleu) et de mortalité (rouge) du cancer de la vessie pour 100 000 personnes, normalisés selon l'âge et classés par localisation et par sexe	80
Figure 3-3. Classification des tumeurs de la vessie	83
Figure 3-4. Comparaison des classifications OMS 1973 et OMS 2004	85
Figure 3-5. Tableaux de risques EORTC pour la prédiction de récurrence et de progression chez des patients atteints d'un cancer de la vessie de stade Ta ou T1.....	86
Figure 4-1. Procédure d'analyse de profils de protéines dans des échantillons biologiques par la technologie ProteinChip®	99
Figure 4-2. Stratégies pour la découverte de biomarqueurs	100
Figure 4-3. Étapes de développement d'un biomarqueur	101
Figure 4-4. Étapes du marquage CE	103
Figure 5-1. Diagramme des principales étapes du projet DIPROMON	118
Figure 5-2. Principe de la technologie HIFI.....	119
Figure 7-1. Protocole général des immunoessais de type sandwich des trousselettes ELISA.....	132
Figure 7-2. Protocole de l'immunoessai en mode direct pour la détection du marqueur EN2	132
Figure 7-3. Réaction du TMB catalysée par la peroxydase de raifort	133
Figure 7-4. Exemple de matrice déposée en fond de puits.....	134
Figure 7-5. Protocole des immunoessais multiparamétriques de type sandwich	135
Figure 7-6. Génération du signal colorimétrique par la phosphatase alcaline	136

Figure 8-1. Représentation schématique des étapes de la sélection des marqueurs	145
Figure 8-2. Concentrations des marqueurs dans les échantillons de patients atteints de cancer de la vessie et de donneurs sains.....	149
Figure 8-3. Courbes ROC du Panel 1 (en noir) et de MMP9 (en gris) pour l'ensemble d'apprentissage et l'ensemble de validation croisée.....	152
Figure 8-4. Représentation schématique des voies de développement de l'invasivité des tumeurs urothéliales.....	153
Figure 8-5. Conception de la seconde étude de sélection de marqueurs.....	156
Figure 9-1. Preuve de concept.....	166
Figure 9-2. Vue d'ensemble du développement des immunoessais multiparamétriques	166
Figure 9-3. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9 et IL8.....	167
Figure 9-4. Évaluation de la réaction croisée de VEGF, MMP9 et IL8	169
Figure 9-5. Influence du temps d'incubation des protéines et anticorps de détection sur la sensibilité des dosages	170
Figure 9-6. Intégration du marqueur EGFR	171
Figure 9-7. Comparaison des courbes d'étalonnages avant (1) et après (2) intégration du marqueur EGFR	172
Figure 9-8. Signaux non spécifiques des anticorps pour la détection de PTGS2.....	173
Figure 9-9. Immunoessai pour la quantification de PTGS2 avec la protéine recombinante produite par Lionex	174
Figure 9-10. Criblage de paires d'anticorps par interférométrie de bio-couche	175
Figure 9-11. Courbe d'étalonnage d'EN2 en utilisant un échantillon urinaire de patient (B003P)	176
Figure 9-12. Comparaison des deux supports.....	177
Figure 9-13. Comparaison des résultats d'analyse selon le type de plaque	178
Figure 9-14. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9 et IL8.....	179
Figure 9-15. Immunoessai pour la quantification d'IL8.....	180
Figure 9-16. Détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-IL8.....	181
Figure 9-17. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9, IL8 et IL6	184
Figure 9-18. Comparaison des courbes d'étalonnage avant (1) et après (2) retrait du marqueur PTGS2 et intégration du marqueur IL6.....	185
Figure 9-19. Évaluation de la réaction croisée de VEGF, MMP9 et IL8	187
Figure 9-20. Détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-IL6.....	188
Figure 9-21. Influence du temps d'incubation des protéines et anticorps de détection sur la sensibilité des dosages	190
Figure 9-22. Influence de l'agitation lors de la phase d'incubation des protéines et anticorps de détection sur la sensibilité des dosages	191
Figure 9-23. Détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-MMP9.....	192
Figure 9-24. Nettoyage des puits par soufflage d'air comprimé.....	193
Figure 9-25. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9, IL8, IL6, CDH1 et ErbB2	194
Figure 9-26. Comparaison des courbes d'étalonnage avant (1) et après (2) intégration des marqueurs CDH1 et ErbB2	195
Figure 9-27. Détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-CDH1 et anti-ErbB2	196
Figure 9-28. Détection de CDH1 dans des échantillons urinaires de patients	197
Figure 9-29. Changement de référence de la protéine de calibration CDH1.....	198

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1. Principales caractéristiques des puces à protéines analytiques	38
Tableau 2-1. Principales caractéristiques d'une plateforme d'immunoessais idéale	58
Tableau 2-2. Résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative	62
Tableau 2-3. Résumé des paramètres à évaluer lors d'une validation d'immunoessai pour biomarqueurs	65
Tableau 2-4. Exemples de tests utilisant la technologie xMAP®	70
Tableau 3-1. Classification TNM 2009 des tumeurs de la vessie de l'UICC	84
Tableau 3-2. Estimation du risque de récurrence et de progression d'une tumeur de la vessie	85
Tableau 3-3. Prise en charge des TVNIM après RTUV et IPOP selon le risque de récurrence et de progression	88
Tableau 3-4. Surveillance des TVNIM selon le risque de récurrence et de progression, d'après les recommandations de la HAS et de l'INCa	90
Tableau 3-5. Surveillance des TVIM, d'après les recommandations de la HAS et de l'INCa	90
Tableau 4-1. Performances des marqueurs urinaires du cancer de la vessie	113
Tableau 6-1. Trousses ELISA utilisées lors de la sélection de biomarqueurs	127
Tableau 8-1. Première évaluation des marqueurs dans des échantillons urinaires	147
Tableau 8-2. Performances individuelles des biomarqueurs classés par valeur d'AUC	150
Tableau 8-3. Performances du meilleur panel déterminé par PanelomiX et du panel final	151
Tableau 8-4. Dosages des biomarqueurs de la seconde étude	157
Tableau 8-5. Performances individuelles des paramètres	159
Tableau 8-6. Performances des modèles de régression linéaire multiple	160
Tableau 9-1. Limites de détection et de quantification de VEGF, MMP9, IL8 et IL6	189
Tableau 9-2. Limites de détection et de quantification de VEGF, MMP9, IL8 et IL6 après instauration de l'agitation	191

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 présentant un potentiel thérapeutique ou diagnostique. 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.

Concernant l'aspect conceptuel, 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. En effet, il est le neuvième cancer le plus fréquent au monde en termes d'incidence et il a la particularité de présenter un fort taux de récurrence (de 50% à 70%) avec une probabilité de progression musculaire dans 10% à 30% des cas. La surveillance des patients est donc une étape importante de la prise en charge et nécessite une optimisation.

Quant à l'aspect technologique, l'avancée de ces dernières décennies dans le domaine des biotechnologies a permis le développement de nouveaux outils d'analyse multiparamétrique, notamment les biopuces. Ainsi, le support technologique du projet repose sur l'application de ces biopuces à la détection de biomarqueurs. 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 plateforme d'immunoessais mesurant les profils de biomarqueurs.

Ce manuscrit comporte trois parties. Une première partie rappelle le contexte de l'étude. Une description de la partie expérimentale est ensuite donnée et la dernière partie correspond aux résultats obtenus lors de ces travaux de thèse. Plus précisément, les premiers chapitres s'intéressent à l'aspect technologique du sujet : les puces à protéines et les plateformes d'immunoessais. Les deux suivants se focalisent sur le cadre clinique du cancer de la vessie et des biomarqueurs puis le cinquième chapitre correspond à une présentation du projet DIPROMON. Les chapitres six et sept sont consacrés à la partie expérimentale. Enfin, les chapitres huit et neuf décrivent les résultats obtenus selon deux

axes : la sélection de biomarqueurs urinaires pour le diagnostic et la récurrence des tumeurs urothéliales ainsi que le développement d'une plateforme d'immunoessais pour la quantification des biomarqueurs.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Les puces à protéines

1. INTRODUCTION

Les biopuces sont des outils permettant l'analyse, la détection ou l'identification de façon simultanée de multiples molécules d'intérêt présentes dans un échantillon. Leur principe repose sur l'immobilisation sur un support solide de surface limitée (silice, verre, polymère etc.) de récepteurs biologiques, ou sondes, formant des plots (*spots*). On utilise le terme anglais *microarray* pour désigner ces biopuces du fait de l'organisation en matrice des sondes immobilisées sur un support miniaturisé (Falciani, 2007). Les sondes peuvent être de nature différente : brins d'ADN, protéines, petites molécules, sucres ou cellules. Elles permettent la reconnaissance spécifique de cibles présentes dans un échantillon, générant un signal pouvant être détecté par diverses méthodes.

Il existe de très nombreux types de biopuces et de classifications de ces outils selon divers paramètres : les sondes ou cibles impliquées, la nature du support, les méthodes de détection des signaux ou encore la densité des sondes. Ce chapitre traitera uniquement les puces à protéines.

1.1. DES PUCES À ADN AUX PUCES À PROTÉINES

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.

Néanmoins, le développement des puces à protéines présente des contraintes différentes de celles des puces à ADN. L'immobilisation de protéines est plus difficilement standardisée que celle des acides nucléiques. En effet, en comparaison aux molécules d'ADN, les protéines sont de nature plus complexe, 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. De plus, il n'existe pas de moyen d'amplification des protéines contrairement à l'ADN qui peut facilement être amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Hartmann *et al*, 2009).

1.2. LA THÉORIE DE L'ANALYTE AMBIANT

Historiquement, le concept des biopuces a été défini par les travaux de Roger Ekins dans les années 1990, définissant la théorie de l'analyte ambiant (*ambient analyte theory*). Cette théorie a été plus particulièrement décrite pour les immunoessais et donc les puces à protéines (Ekins, 1989; Ekins & Chu, 1991; Wild, 2005). Alors que les immunoessais classiques mesurent une quantité d'analyte dans un volume spécifique d'échantillon, les immunoessais miniaturisés (comme les puces à protéines)

permettent de mesurer la concentration d'analyte indépendamment du volume de l'échantillon. En effet, dans le cadre d'un immunoessai miniaturisé les anticorps sont présents à une quantité si faible que leur liaison avec l'analyte de l'échantillon ne diminue pas de façon significative la quantité d'analyte dans le milieu environnant. Le taux d'occupation des sites de liaison des anticorps reflète donc la concentration de l'analyte ambiant. Ainsi, les immunoessais miniaturisés sont indépendants de la quantité d'anticorps utilisé si la concentration de ce dernier est inférieure à $0,1/K$, K étant la constante d'affinité de l'anticorps.

Selon la théorie de l'analyte ambiant, les immunoessais miniaturisés ont donc une meilleure sensibilité car le complexe analyte-molécule de capture est contenu dans une petite zone (le micro-plot), permettant un signal local élevé. Ce principe est décrit dans la Figure 1-1 ci-dessous. Lorsque la taille du plot augmente, la quantité de molécules de capture augmente également, augmentant ainsi le signal total du plot. Cependant, la densité du signal va diminuer avec l'augmentation de la taille du plot puisque les complexes analyte-molécule de capture seront distribués sur une plus grande surface (le facteur limitant devient la quantité d'analyte). En diminuant la taille du plot, le signal total sera diminué mais la densité du signal va elle augmenter. Ainsi, en-dessous d'une certaine taille de plot (correspondant à une concentration de molécule de capture $< 0,1/K$), les conditions de l'analyte ambiant sont atteintes et la densité du signal restera constante. Par conséquent, il est possible d'obtenir un signal plus élevé et un rapport signal sur bruit optimal grâce à la miniaturisation des immunoessais (Templin *et al*, 2002).

Outre l'augmentation de la sensibilité, les immunoessais miniaturisés présentent aussi des cinétiques de réaction plus rapides du fait de la diminution des contraintes de diffusion. Un autre avantage est la possibilité d'utiliser de faibles volumes d'échantillon puisque la mesure des concentrations d'analyte est indépendante du volume d'échantillon.

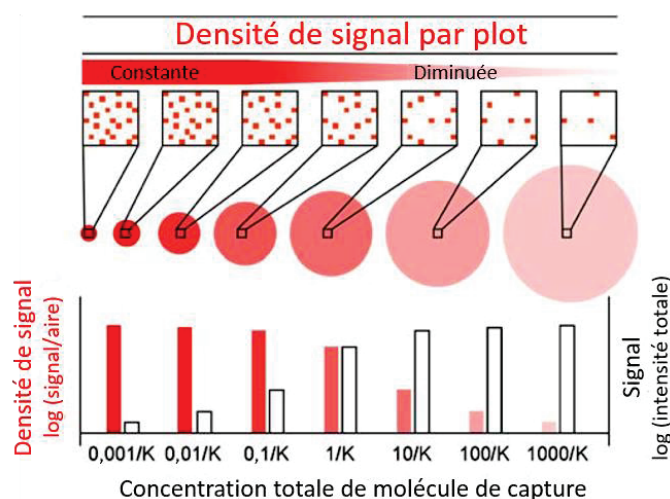


Figure 1-1. Signal et densité de signal de micro-plots à différentes concentrations de molécule de capture (adapté de Hartmann *et al*, 2009). K , constante d'affinité

1.3. CONCEPTION DE PUCES À PROTÉINES

Quel que soit le type de puces à protéines, leur conception suit plusieurs étapes déterminantes résumées dans la Figure 1-2 (Mortuaire *et al*, 2004; Kingsmore, 2006; Hall *et al*, 2007) :

- Le choix du type de support : la détermination du support dépend du type d'interaction désiré entre la molécule de capture et le support (covalente ou non covalente). Les premiers supports utilisés étaient des supports en verre (sous forme de lame de microscopie) ou en silicium pouvant être activés par diverses chimies de surface. Il existe maintenant de nombreux autres supports comme les micropuits (plaques de microtitration) ou les microsphères.
- Le choix du mode d'interaction et de fixation de la molécule de capture : le choix de la sonde (anticorps, antigène ou autre molécule de capture) est adapté selon l'application recherchée.
- Le choix du mode de dépôt des molécules de capture : différentes techniques robotisées de dépôt de sondes sont possibles, permettant la création de matrices de plots. On distingue deux principales méthodes : par contact (à l'aide de pointes pleines ou creuses) et non-contact. Quant aux microsphères, elles sont en suspension et fonctionnalisées par les molécules de capture.
- Le choix de la méthode de détection et du mode de révélation : le mode de révélation est guidé par le choix de la méthode de détection. Il existe deux principales catégories de techniques de détection : avec et sans marquage. Celles-ci seront développées dans la section 3 de ce chapitre.

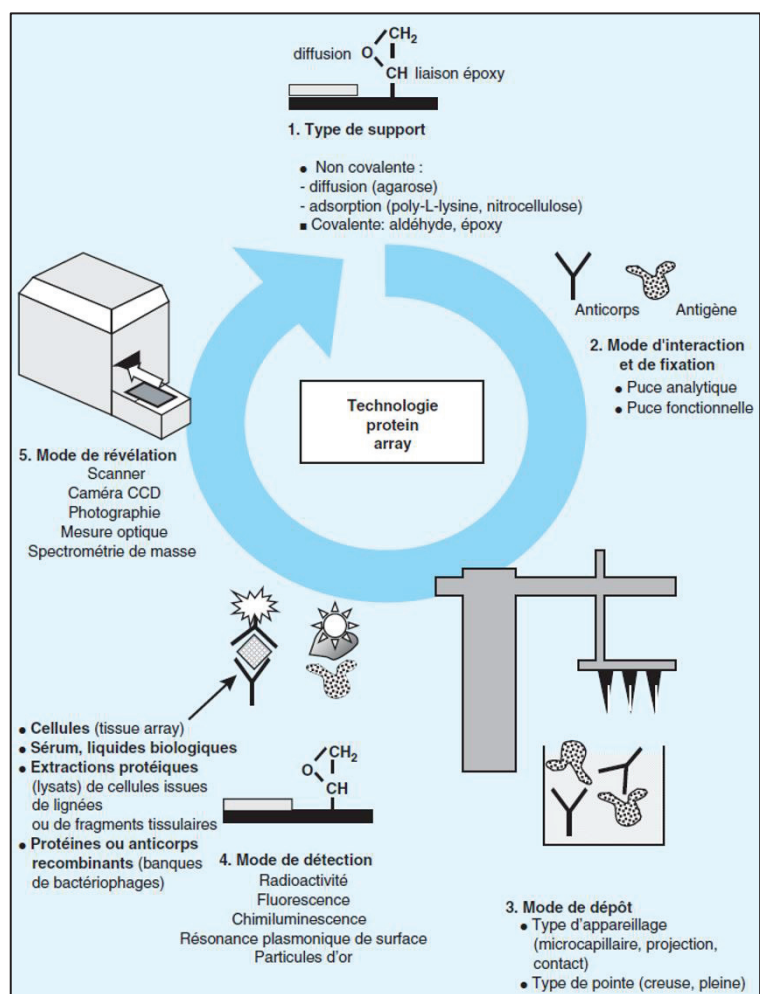


Figure 1-2. Étapes de la conception d'une puce à protéines (extrait de Mortuaire et al, 2004) CCD, dispositif à transfert de charge

2. TYPES DE PUCES À PROTÉINES

De nombreux formats de puces à protéines existent. Ils sont généralement divisés en deux grandes classes : les puces à protéines fonctionnelles et les puces à protéines analytiques.

2.1. 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 (Zhu & Snyder, 2003; Mortuaire *et al*, 2004; Kersten *et al*, 2005). Des exemples d'interactions sont illustrés dans la Figure 1-3.

Les utilisations variées en recherche fondamentale de ce type de puce ont été décrites dans de nombreuses 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, dont la preuve de concept avait été démontrée en 2001 par Zhu *et al.* (Zhu *et al.*, 2001; Schweitzer *et al.*, 2003). 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 (Michaud *et al.*, 2003). Les applications ont depuis considérablement évolué et d'autres exemples de puces à protéines fonctionnelles sont détaillés dans la section 3 de ce chapitre.

2.2. 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 notamment le suivi de l'expression de protéines à grande échelle (*protein profiling*). Elles possèdent de nombreuses possibilités d'applications (décrites dans la section 3).

La plupart de ces puces utilise 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 formats planaires (*planar microarrays*) et les formats non planaires ou en suspension (*suspension* ou *bead-based microarrays*) (Figure 1-4).

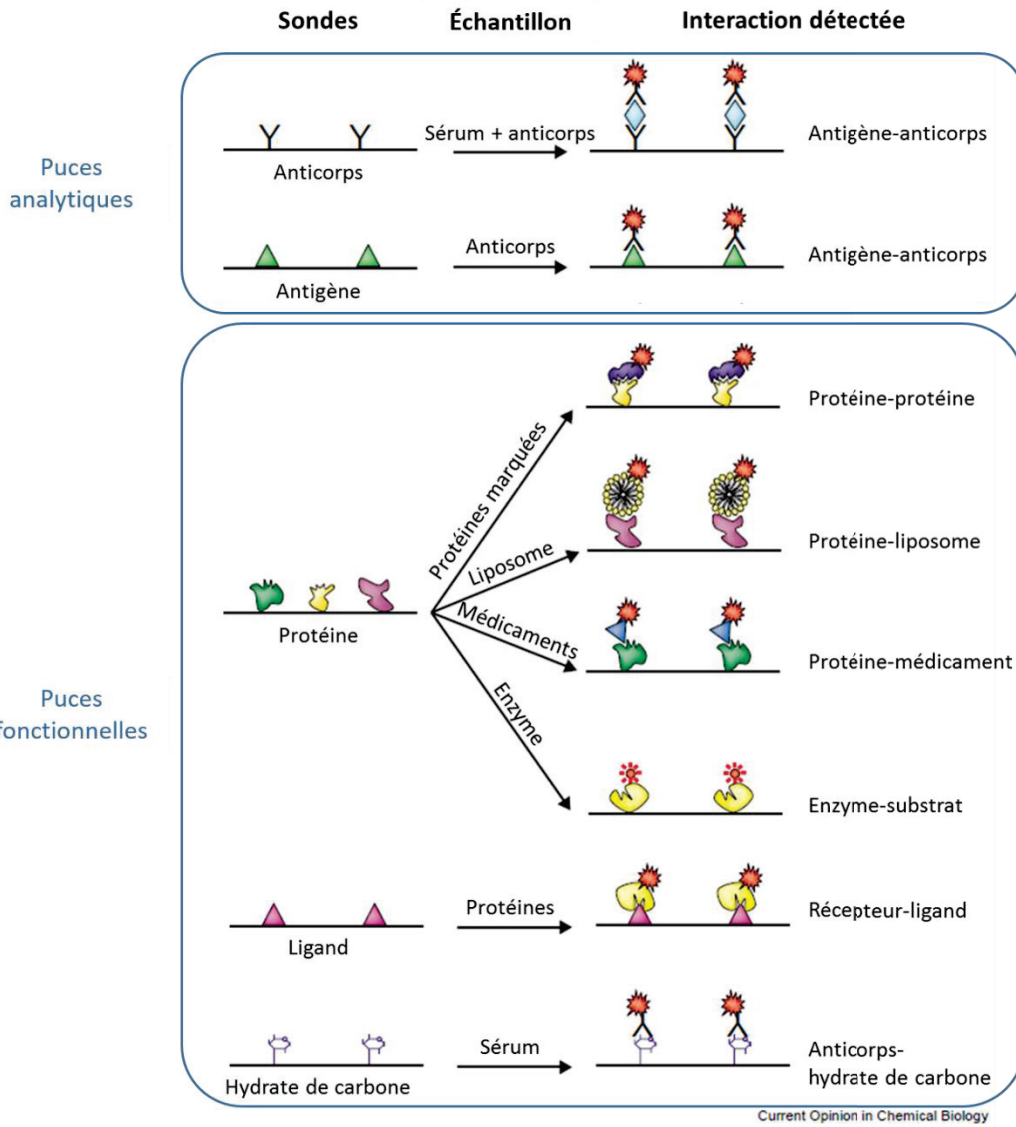


Figure 1-3. Types de puces à protéines (adapté de Zhu & Snyder, 2003)

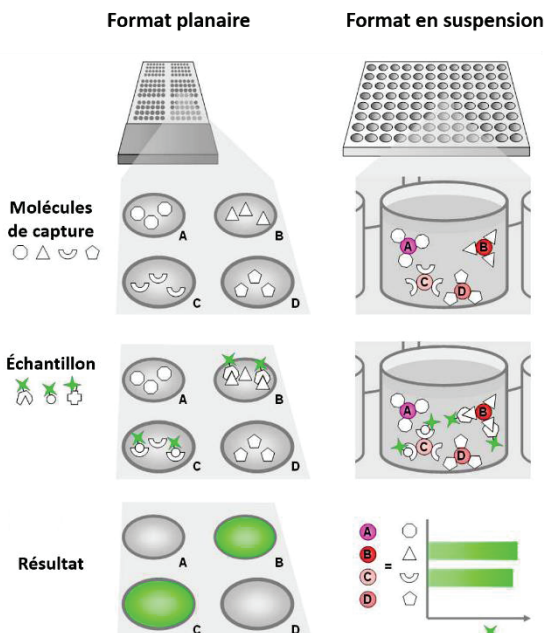


Figure 1-4. Formats de puces à protéines analytiques (adapté de Hartmann et al, 2009)

2.2.1. FORMATS PLANAIRES

Les puces à protéines au format planaire sont fondées sur la reconnaissance antigène-anticorps et utilisent généralement les mêmes principes que les dosages immunologiques classiques comme les dosages d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Ce sont donc des immunoessais miniaturisés utilisant des molécules de capture immobilisées sur un support solide, formant des plots. Les principales stratégies d'immunoessais multiparamétriques utilisant un marquage sont illustrées dans la Figure 1-5. Dans la méthode dite directe, les protéines de l'échantillon à analyser sont immobilisées sur le support et la détection se fait grâce à des anticorps marqués et spécifiques de certaines protéines de l'échantillon. La méthode indirecte suit le même principe d'immobilisation des protéines à analyser mais celles-ci sont détectées par un anticorps primaire lui-même reconnu par un anticorps secondaire marqué. Quant à la méthode par capture d'antigène, les protéines à analyser sont préalablement marquées, permettant une détection sans intermédiaire lors de leur interaction avec les anticorps de capture immobilisés (MacBeath, 2002). 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. Enfin, la stratégie de compétition peut augmenter la sensibilité de l'immunoessai : un antigène sonde est immobilisé sur le support tandis que l'anticorps de détection est en solution avec l'échantillon contenant la protéine à détecter. L'antigène sonde et l'antigène de l'échantillon sont donc en compétition pour interagir avec l'anticorps marqué (Zhu & Snyder, 2003; Haab, 2005).

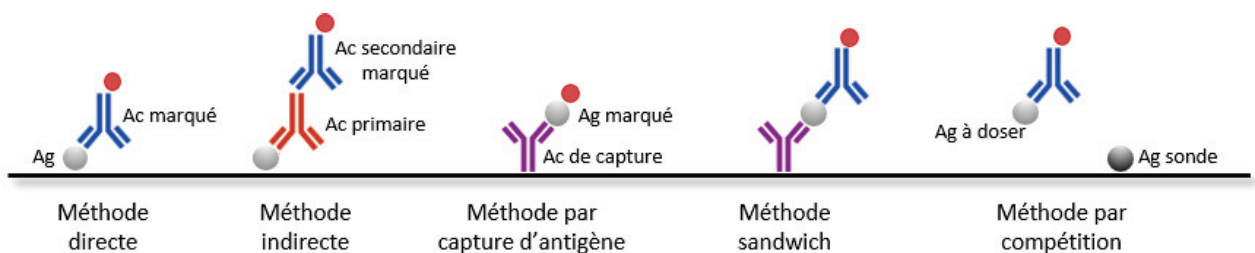


Figure 1-5. Stratégies d'immunoessais multiparamétriques. Ag, antigène ; Ac, anticorps

Il est également courant de classer les puces à protéines planaires en deux grandes catégories : les formats en phase directe (*forward phase arrays*) et les formats en phase inverse (*reverse phase arrays*). Ces deux catégories se différencient par la façon dont l'échantillon à analyser est utilisé (Figure 1-6). Le format en phase directe correspond à des puces sur lesquelles sont immobilisées des molécules de capture. Chaque plot contient un type de molécule de capture (anticorps ou protéine) et l'ensemble des plots différents permet l'analyse de multiples paramètres dans un seul échantillon. En revanche, dans le format en phase inverse, c'est l'échantillon qui est immobilisé sur le support, chaque plot contient donc de multiples analytes représentant un seul échantillon clinique. Le support inclut alors

de multiples échantillons qui sont analysés par une seule molécule de détection (Espina *et al*, 2003; Liotta *et al*, 2003; Hartmann *et al*, 2009).

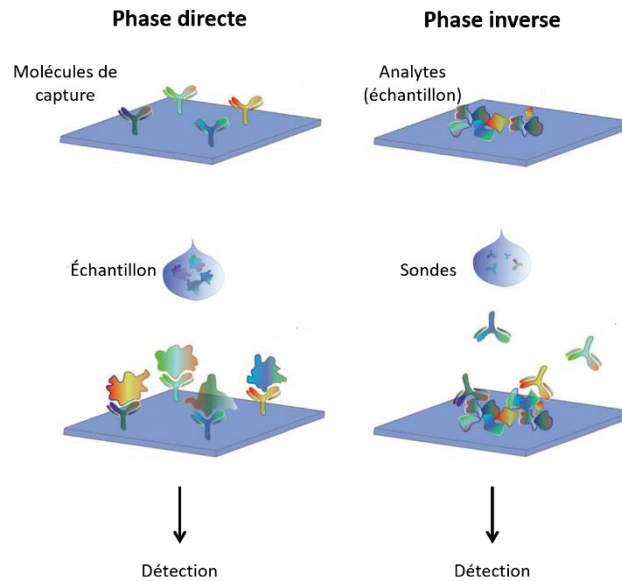


Figure 1-6. Les formats planaires en phase directe et phase inverse (adapté de Romanov *et al*, 2014)

2.2.2. FORMATS EN SUSPENSION

Les formats en suspension sont basés sur l'utilisation de microsphères (billes ou *beads*) sur lesquelles sont immobilisées les molécules de capture. Pour les formats planaires, l'identification de chaque complexe analyte-molécule de capture se fait grâce à leur position dans la matrice (identification du plot) tandis que les formats en suspension utilisent d'autres stratégies d'identification : la différenciation des microsphères se fait par leur taille ou leur couleur. Les analytes capturés à la surface des billes sont généralement détectés grâce à la cytométrie en flux (Joos *et al*, 2002; Hsu *et al*, 2009; Jun *et al*, 2012). Le principe du format en suspension est décrit dans la Figure 1-7.

La plateforme la plus populaire est la technologie xMAP® de Luminex (www.luminexcorp.com) qui permet de mettre au point des tests multiparamétriques à partir d'une centaine de billes à code de couleur. 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 lors de la détection : le laser rouge (630 nm) permet l'identification de la bille et le laser vert (532 nm) permet la détection de l'interaction entre l'agent de capture présent sur la bille et l'analyte (Rao *et al*, 2004; Kersten *et al*, 2005; Hartmann *et al*, 2009). Cette technologie est utilisée dans de nombreux tests commercialisés dont les tests BioPlex® de Bio-

Rad (www.bio-rad.com). D'autres exemples de cette technologie sont détaillés dans le Chapitre 3 concernant les plateformes d'immunoessais.

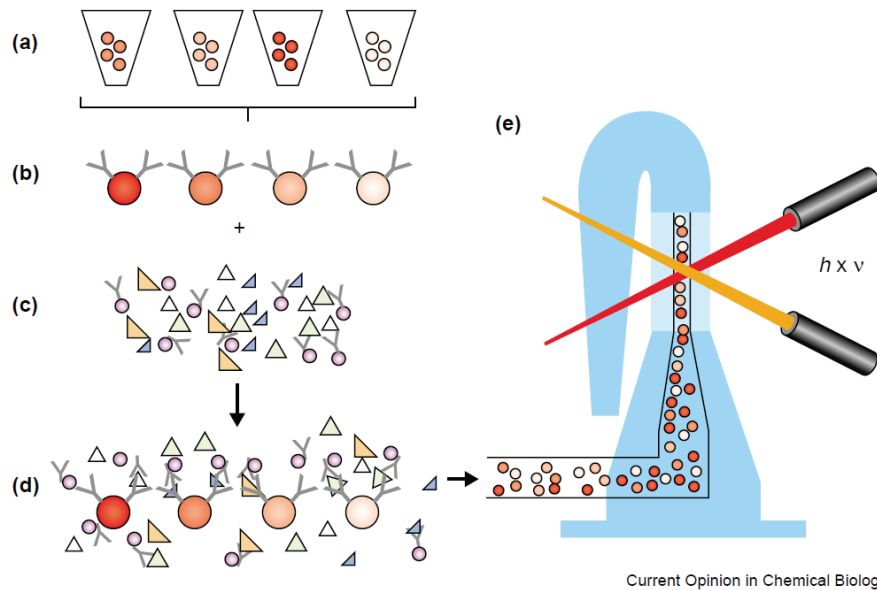


Figure 1-7. Principe du format en suspension (a) Les anticorps de captures sont immobilisés sur des populations distinctes de microsphères (b) Les populations de microsphères couplées aux anticorps de capture sont incubées avec (c) l'échantillon et des anticorps de détection couplés à des fluorochromes (d) La formation du complexe de type sandwich est mesurée et quantifiée par (e) cytométrie en flux. Un premier laser (par exemple, rouge à une longueur d'onde de 630 nm) permet l'identification de la bille et un deuxième laser (par exemple, vert à une longueur d'onde de 532 nm) permet la détection du complexe (extrait de Joos et al, 2002)

Concernant la classification des puces à protéines présentée ci-dessus, celle-ci n'est qu'une proposition parmi d'autres. Par exemple, les formats en suspension sont parfois aussi considérés comme des formats en phase directe. Il existe également des formats « hybrides » comme les puces à protéines d'AYOXXA (www.ayoxxa.com) qui combinent les microsphères des formats en suspension avec un format planaire (Figure 1-8, a). Ces puces reposent sur une technologie brevetée : *in-situ encoded bead-based array* (IEBA) qui permet l'identification de chaque type de microsphère par leur position sur la surface. En effet, chaque population de microsphères (sur lesquelles est immobilisé un type de molécule de capture) est déposée sur la puce séparément. Une image de la surface de la puce est prise entre chaque dépôt pour permettre d'enregistrer leur localisation (Figure 1-8, b).

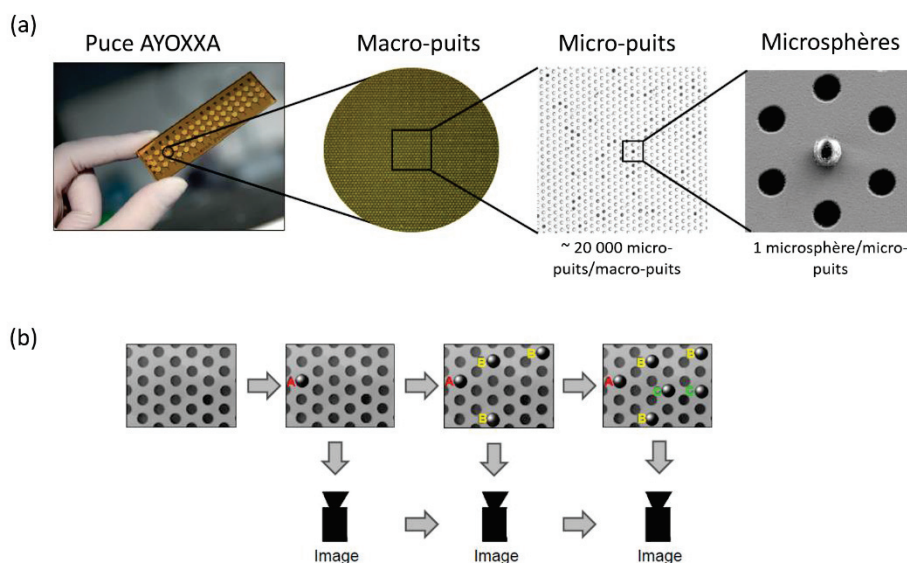


Figure 1-8. Puce à protéines AYOXXA. (a) Structure de la puce (b) Technologie in-situ encoded bead-based array (IEBA) (adapté de Röglin, 2013)

Il existe donc de nombreux types de puces à protéines, notamment pour les puces à protéines analytiques. Les caractéristiques des principaux formats sont résumées dans le Tableau 1-1.

Tableau 1-1. Principales caractéristiques des puces à protéines analytiques (adapté de Yu et al, 2010)

Caractéristiques	Formats planaires		Formats en suspension (microsphères)
	Phase directe	Phase inverse	
Immobilisation	Molécules de capture (protéines, peptides, anticorps)	Échantillons (lysats cellulaires ou tissulaires)	Molécules de capture (protéines, peptides, anticorps)
Marquage de l'analyte	Avec ou sans	Sans	Avec ou sans
Quantification	Relative ou absolue	Relative	Relative ou absolue
Nombre de plots différents (ou microsphères)	> 1000	> 1000	≤ 100
Débit	Bas	Bas	Haut
Automatisation	Basse	Basse	Haute

3. MÉTHODES DE DÉTECTION

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

3.1. DÉTECTION AVEC MARQUAGE

Les principaux types de marquage sont le marquage fluorescent, le marquage chimiluminescent et le marquage colorimétrique. Il est également possible d'effectuer un marquage radioactif. Bien que cette dernière technique soit 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.

3.1.1. MARQUAGE FLUORESCENT

Le marquage par des sondes fluorescentes est la méthode la plus courante dans les systèmes miniaturisés. Ces sondes stables et facilement utilisables permettent une haute sensibilité de détection. Les fluorophores sont caractérisés par leur longueur d'onde d'excitation (longueur à laquelle ils absorbent l'énergie lumineuse) ainsi que leur longueur d'onde d'émission (longueur à laquelle ils restituent une partie de cette énergie sous forme de photon). Ainsi, ce type de marquage présente l'avantage de permettre une détection simultanée de plusieurs analytes grâce à l'utilisation de différentes sondes fluorescentes (Albala & Humphery-Smith, 2003)

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 : toutes les protéines sont alors marquées avec un fluorophore. Cette méthode 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 présente dans le sérum (Angenendt, 2005). Une alternative aux fluorophores est le marquage des protéines de l'échantillon par un haptène, tel que la biotine. Ce dernier sera ensuite lui-même détecté au cours d'une seconde incubation. Les haptènes sont des molécules de faible poids moléculaire capables de réagir avec un anticorps mais non immunogènes. Ils ont l'avantage d'être plus stables que les fluorophores et d'apporter moins de modifications aux protéines auxquelles ils sont liés (Haab, 2003).

La méthode indirecte utilise généralement des anticorps de détection marqués. Le format le plus utilisé est la méthode sandwich (décrite précédemment dans la Figure 1-5). L'anticorps de détection peut être lui-même directement marqué ou être reconnu par un anticorps secondaire marqué. Les anticorps

sont marqués par des fluorophores (immunofluorescence) mais peuvent également être marqués par des enzymes (tests immunoenzymatiques), on parle alors de marquage chimiluminescent ou colorimétrique (Syahir *et al*, 2015).

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 la détection de cibles d'intérêt. Elle a d'abord été décrite en 1998 pour la discrimination d'allèles (Lizardi *et al*, 1998). Cette stratégie a ensuite été appliquée aux puces à protéines pour la détection d'anticorps liés aux protéines d'intérêt. Elle repose sur l'extension enzymatique d'un conjugué anticorps-amorce puis la détection du brin d'ADN généré par hybridation de sondes fluorescentes (Figure 1-9). Elle offre une sensibilité élevée, une gamme dynamique étendue et une bonne reproductibilité (Schweitzer *et al*, 2000, 2002).

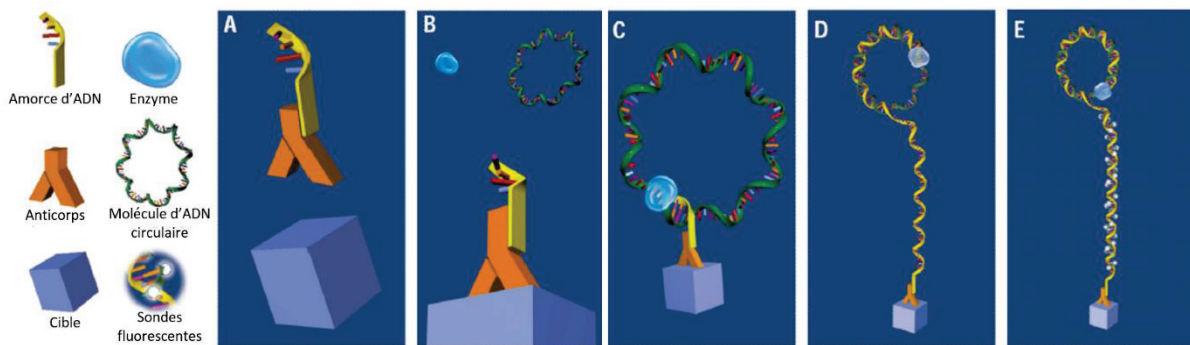


Figure 1-9. Immunoessai avec amplification de signal par RCA (adapté de Schweitzer *et al*, 2002). (A) Une amorce d'oligonucléotides est liée à l'anticorps de détection par son extrémité 5' (B) Le conjugué anticorps-ADN se lie spécifiquement à la molécule cible (C) Une molécule d'ADN circulaire s'hybride 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 de multiples sondes fluorescentes et complémentaires. RCA, rolling circle amplification

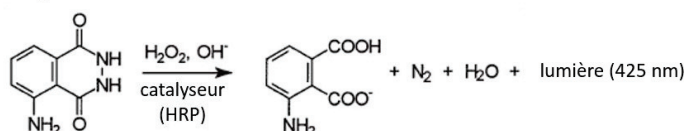
3.1.2. MARQUAGE CHIMILUMINESCENT

La chimiluminescence est une émission de lumière suite à une réaction chimique au cours de laquelle une molécule entre dans un état excité puis retourne à l'état fondamental en émettant un photon. Contrairement à la fluorescence, la chimiluminescence ne nécessite pas de source lumineuse. Le seul signal lumineux provient donc des molécules chimiluminescentes, limitant le bruit de fond et apportant une forte sensibilité à cette méthode (Roda *et al*, 2000; Wild, 2005).

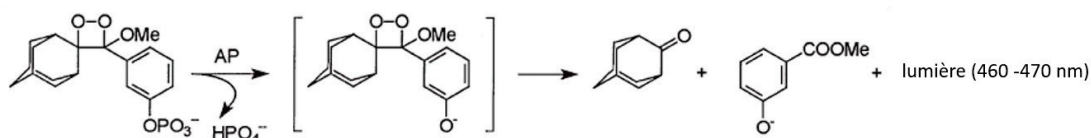
Il existe de nombreuses combinaisons possibles de systèmes chimiluminescents avec les immunoessais. Une revue de Rongen *et al*. de 1994 liste plus de 60 immunoessais utilisant le marquage chimiluminescent (Rongen *et al*, 1994). Divers formats ont donc été décrits incluant le marquage de l'analyte ou de l'anticorps par l'enzyme catalysant la réaction ou encore par le substrat.

La principale stratégie implique le marquage par des enzymes catalysant une réaction chimique qui produit de la chimiluminescence. Les enzymes majoritairement utilisées sont la peroxydase de raifort (HRP, *horseradish peroxidase*) et la phosphatase alcaline. La peroxydase de raifort permet l'émission de chimiluminescence par oxydation du luminol ou de l'isoluminol, composés chimiluminescents. Quant à la phosphatase alcaline, elle catalyse la désphosphorylation de dérivés 1,2-dioxétane, tel que l'adamantyl-1,2-dioxétane phényl-phosphate, produisant un intermédiaire instable. La décomposition de ce dernier permet la formation d'un aryl ester à l'état excité, produisant un photon lors de son retour à l'état fondamental. Outre le marquage enzymatique, il est également possible d'utiliser un marquage direct par des composés chimiluminescents tels que les esters d'acridinium (Roda *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2009). Les principales réactions de chimiluminescence utilisées en chimie analytique sont décrites dans la Figure 1-10.

Oxydation du luminol



Décomposition de 1,2-dioxétanes par catalyse enzymatique



Oxydation d'esters d'acridinium

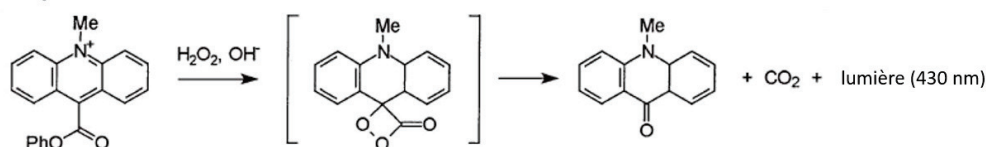


Figure 1-10. Principales réactions de chimiluminescence utilisées en chimie analytique (adapté de Roda *et al*, 2000)
AP, phosphatase alcaline

Dû au manque de sensibilité de certaines méthodes de détection par chimiluminescence, de nouvelles stratégies ont été développées, notamment l'amplification du signal. Une approche développée par Marquette *et al.* permet d'améliorer le signal chimiluminescent grâce à un complexe macromoléculaire composé d'une structure de dextrane portant des résidus biotines, sur lequel est greffé un grand nombre de molécules d'enzyme (HRP). Ce complexe a été utilisé pour la détection d'anticorps anti-HIV-1 sur des plaques de microtitration ainsi que sur une puce basée sur des billes en latex. Une diminution d'un facteur 10 de la limite de détection et une augmentation maximale de signal d'un facteur 20 ont été observées sur les deux types de supports (Marquette *et al*, 2006).

Une approche similaire décrite par Li *et al.* utilise un complexe de streptavidine et d'enzyme HRP polymérique (polyHRP), qui peut contenir jusqu'à 400 molécules d'enzyme. Cette méthode de marquage a été comparée à un marquage classique à l'HRP sur un ELISA en dosage compétitif et a démontré la génération d'un signal 19 fois plus élevé ainsi qu'une sensibilité multipliée par 2 (Li *et al.*, 2013). De plus, la polyHRP a récemment permis une meilleure sensibilité lors du développement d'une puce à protéines pour la détection simultanée de molécules de différentes tailles (Szkola *et al.*, 2014). Pour cela, la puce à protéines inclut à la fois un immunoessai en dosage compétitif pour les petites molécules et un immunoessai de type sandwich pour les plus grandes (Figure 1-11.).

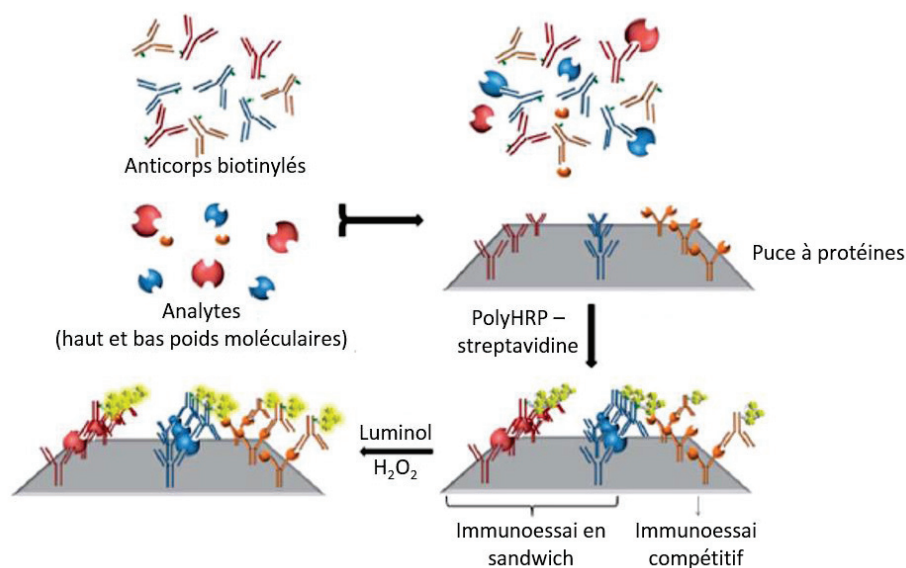


Figure 1-11. Puce à protéines en double format (adapté de Szkola *et al.*, 2014)

3.1.3. MARQUAGE COLORIMÉTRIQUE

Du fait de son plus faible coût et de sa facilité d'utilisation par rapport aux techniques de fluorescence et de chimiluminescence, la détection par marquage colorimétrique est largement développée. Une des méthodes de colorimétrie est l'utilisation d'enzymes catalysant la formation d'un précipité coloré à la surface du support. Les deux principales enzymes sont la phosphatase alcaline et la peroxydase de raifort, qui sont également impliquées dans la détection par chimiluminescence (avec des substrats différents que ceux utilisés en colorimétrie). La phosphatase alcaline permet la déphosphorylation du 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) générant un intermédiaire bromochloroindoxyle. Ce dernier est alors oxydé par le bleu de nitrotétrazolium (NBT) pour produire un précipité violet. La réduction du NBT produit également un formazan bleu et insoluble. Ainsi, la combinaison de deux produits de réaction forme un précipité bleu-violet. Quant à la peroxydase de raifort, elle catalyse l'oxydation du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) en présence de peroxyde d'hydrogène, permettant la formation d'un précipité bleu.

Les puces à détection colorimétrique sont majoritairement développées pour des immunoessais sur des formats de plaques de microtitration, généralement grâce au greffage de l'enzyme à l'un des anticorps du test. Par exemple, une plateforme multiparamétrique et haut-débit a été développée par notre groupe, combinant le format de plaque 96-puits avec la technologie des puces à protéines. En effet, au fond de chaque puits se trouve une matrice de plots permettant la détection simultanée de multiples paramètres (Le Goff *et al*, 2010a). Cette plateforme a été utilisée pour diverses applications, notamment pour la détection d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes associés aux tumeurs (Desmet *et al*, 2011), pour le diagnostic des allergies (Le Goff *et al*, 2010b, Figure 1-12) ou encore pour la détection de polluants (Desmet *et al*, 2013).

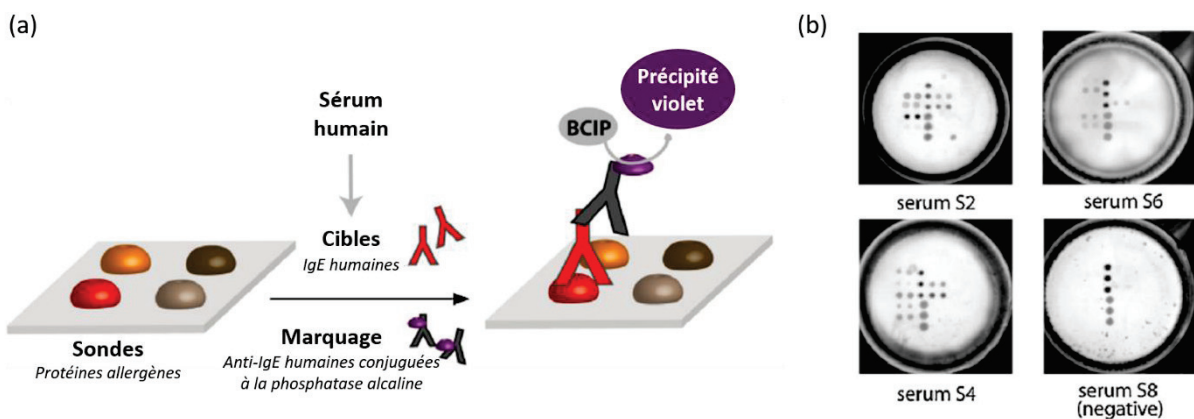


Figure 1-12. Puce à protéine pour le diagnostic de l'allergie (adapté de Le Goff *et al*, 2010b). (a) Stratégie de détection d'IgE avec marquage à la phosphatase alcaline des anticorps secondaires (b) Images de 4 puits correspondant à des échantillons réactifs aux allergènes (S2, S4 et S6) et un échantillon négatif (S8). IgE, immunoglobuline E

Un principe similaire a été utilisé par Gehring *et al*. pour la détection de Shiga-toxines (Stx1 et Stx2) produites par *Escherichia coli*. Les auteurs ont développé une plateforme d'immunoessais de type sandwich sur une plaque de microtitration 96-puits en polystyrène. Des anticorps de capture anti-toxines ont été immobilisés au fond des puits. Après l'incubation de l'échantillon, la détection par marquage colorimétrique a été réalisée grâce à l'anticorps de détection conjugué à la peroxydase de raifort. Leur test a permis de détecter de faibles concentrations de Stx1 et Stx2 allant jusqu'à 4,5 ng/mL (Gehring *et al*, 2014).

Récemment, il a été démontré la possibilité d'utiliser deux enzymes différentes, la phosphatase alcaline et la peroxydase de raifort, dans un même immunoessai pour pouvoir détecter de multiples analytes. Jiang *et al*. ont en effet développé un ELISA en format compétitif permettant la détection dans le lait de plusieurs résidus d'antibiotiques (fluoroquinolones et sulfamides) (Jiang *et al*, 2013). Pour cela, les antigènes préalablement immobilisés au fond des puits entrent en compétition avec les antigènes présents dans l'échantillon pour interagir avec les anticorps correspondants. Ces derniers sont détectés par des anticorps marqués, par la phosphatase alcaline pour les fluoroquinolones et par

la HRP pour les sulfamides. Il y a alors une première lecture colorimétrique après l'ajout du substrat de la phosphatase alcaline puis une deuxième lecture après lavage et l'ajout du substrat de la HRP. Les deux détections se font donc à la suite, au sein du même puits (Figure 1-13).

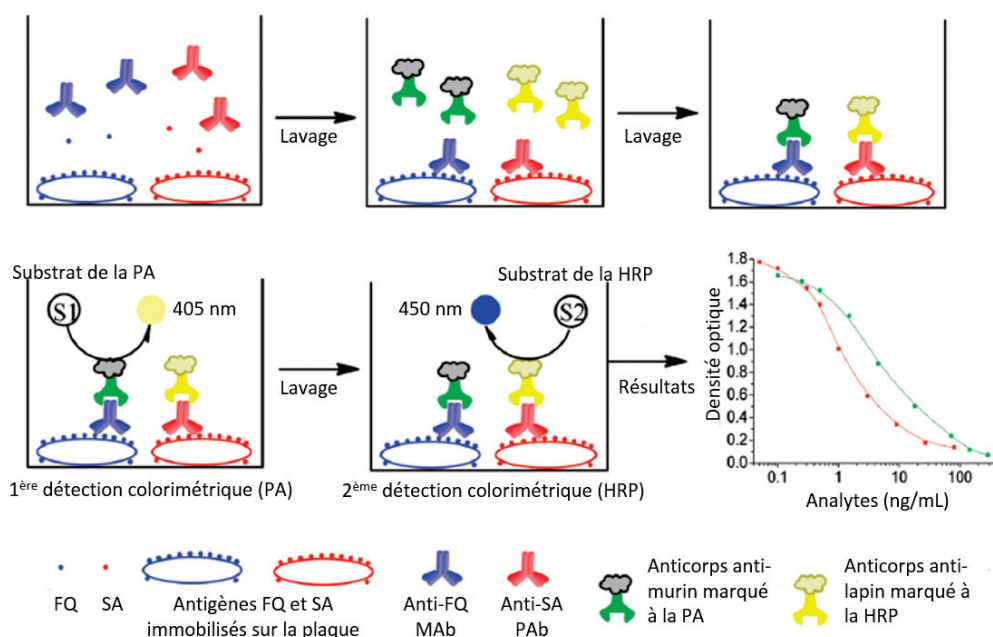


Figure 1-13. Stratégie de double détection colorimétrique par deux enzymes différentes (adapté de Jiang et al, 2013)
 Les anticorps de détection des antigènes proviennent de deux espèces différentes (souris et lapin), permettant leur interaction spécifique avec les anticorps marqués. FQ, fluoroquinolones ; SA, sulfamides ; MAb, anticorps monoclonal ; PAb, anticorps polyclonal ; PA, phosphatase alcaline ; HRP, peroxydase de raifort

Les nanoparticules d'or sont une seconde approche de marquage. Du fait de leurs caractéristiques physiques et chimiques distinctes, elles sont largement utilisées dans le développement de système de détection, que ce soit des systèmes à détection colorimétrique, fluorescente ou électrochimique. Concernant la détection colorimétrique, elle utilise les propriétés optiques des nanoparticules d'or d'une certaine taille (dont le diamètre est supérieur à 3,5 nm). En effet, l'agrégation de ces dernières entraîne un changement de couleur dû à leur résonance plasmonique de surface : la solution passe d'une couleur rouge à violette à des concentrations nanomolaires (Saha *et al*, 2012). Le couplage de ces particules à des biomolécules d'intérêt permet donc la détection d'interactions.

Les nanoparticules d'or ont notamment été utilisées pour détecter de façon directe l'activité de la hyaluronidase, un des marqueurs urinaires du cancer de la vessie. L'interaction entre les nanoparticules d'or cationiques et l'acide hyaluronique anionique entraîne la formation d'agrégats et le passage d'une coloration bleue à violette. En présence de hyaluronidase, l'acide hyaluronique est hydrolysé, empêchant la formation d'agrégats et le changement de coloration (Nossier *et al*, 2014).

Enfin, il existe une méthode d'amplification du signal généré par les nanoparticules d'or grâce à la précipitation d'argent. L'or a une activité catalytique qui permet la réduction des ions argent en argent

métallique, formant un dépôt sur les nanoparticules d'or et augmentant ainsi leur taille. Cette technique a d'abord été utilisée pour les puces à ADN avec une sensibilité similaire à la détection par fluorescence (Alexandre *et al*, 2001). Elle a également été appliquée aux puces à protéines. Par exemple, Liang *et al*. ont développé une puce sur laquelle sont immobilisées des immunoglobulines G (IgG) humaines. Celles-ci sont détectées par des anticorps anti-IgG biotinylés qui interagissent ensuite avec la streptavidine conjuguée à des nanoparticules d'or. Enfin, le signal est amplifié par l'ajout d'une solution contenant des ions argent Ag⁺ (Liang *et al*, 2004).

3.2. DÉTECTION SANS MARQUAGE

Il est également possible de détecter les interactions des puces à protéines sans utiliser de marquage. Les systèmes sans marquage ont l'avantage de ne pas perturber la fonctionnalité des molécules, contrairement aux méthodes utilisant des marqueurs. Quelques exemples de méthode de détection sans marquage sont décrits ci-dessous.

3.2.1. RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPR)

La SPR est une technique basée sur la génération d'ondes évanescentes par un faisceau de lumière polarisée monochromatique. Ces ondes se déplacent à la surface d'une couche métallique telle que l'or et engendrent une oscillation de ses électrons libres. On parle alors de résonance plasmonique de surface. Cette résonance provoque une chute de l'intensité à un angle de réflexion minimum, l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. Ainsi, tout changement dans l'environnement proche de l'interface, tel qu'une interaction entre des sondes immobilisées sur la surface et des molécules biologiques, produit une modification de l'angle de résonance.

Une détection multiparamétrique est également possible (SPRi, *SPR imaging*) grâce à une caméra CCD visualisant la surface et enregistrant l'évolution de la réflectivité de la lumière incidente à un angle fixe. Cette technique, dont les premiers travaux ont été notamment réalisés par l'équipe de Robert Corn, permet de suivre simultanément les interactions de centaines de molécules biologiques et d'étudier leur cinétique (Thie *et al*, 1997; Jordan *et al*, 1997; Yu *et al*, 2006).

En 2009, Ladd *et al*. ont décrit une détection directe de marqueurs tumoraux, des auto-anticorps, grâce à un biocapteur basé sur la SPR et ont démontré le potentiel de cette technique pour la découverte de nouveaux biomarqueurs (Ladd *et al*, 2009).

Un autre avantage de cette méthode est la possibilité d'automatisation. Les systèmes Biacore, actuellement commercialisés par GE Healthcare (www.gelifesciences.com, www.biacore.com), font partie des principaux systèmes automatisés basés sur la SPR. Le Biacore™ 4000 est une de leurs

solutions et permet une analyse à haut-débit d'interactions moléculaires. Il peut analyser jusqu'à 4 800 interactions en 24 heures et est destiné à la découverte de candidats-médicaments.

3.2.2. MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE (AFM) ET MICRO-LEVIERS

La microscopie à force atomique a été développée par l'équipe de Binnig dans les années 1980 (Binnig *et al*, 1986). Son principe repose sur l'utilisation d'une pointe métallique ou en silicium liée à un micro-levier flexible. Ce dernier est sensible à la force entre la pointe et la surface analysée. Ainsi, lors du balayage de la pointe sur la surface, les déviations de la pointe provoquent une déformation du micro-levier qui pourra être détectée par la réflexion d'un laser. On obtient alors la topographie précise de la surface. Les applications de cette méthode incluent la caractérisation des surfaces de puces à protéines, l'immobilisation de molécules biologiques avec une résolution de l'ordre du micromètre et la détection des interactions entre protéines (Yu *et al*, 2006; Gonzalez-Gonzalez *et al*, 2012).

D'autres systèmes basés sur les micro-leviers, sans la nécessité d'une pointe, ont ensuite été développés : on parle de puces à micro-leviers (*microcantilever arrays*). Au début des années 2000, il a été prouvé que cette technique est suffisamment sensible et spécifique pour la détection de biomarqueurs tel que l'antigène prostatique spécifique (PSA, *prostate-specific antigen*) (Wu *et al*, 2001). La faisabilité d'un format de puce de micro-leviers, a également été démontrée pour la détection multiparamétrique d'oligonucléotides et de protéines (Thompson *et al*, 2005). Les puces à micro-leviers présentent une résolution latérale submicrométrique tandis que leur résolution verticale est de l'ordre de l'ångstrom (Carrascosa *et al*, 2006).

Cette méthode de détection a permis de réduire la taille des puces à l'échelle nanométrique, on parle de *nanoarrays*. En comparaison aux puces de type *microarray*, les *nanoarrays* présentent plusieurs avantages. En effet, l'analyse par des *nanoarrays* ne nécessite qu'une très faible quantité d'échantillon et permet une sensibilité et un débit améliorés (Yu *et al*, 2006).

3.2.3. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

L'intégration de la technologie de spectrométrie de masse aux puces à protéines permet une analyse et une identification haut-débit de profils protéiques. La méthode la plus utilisée est la spectrométrie de masse à temps de vol d'ions désorbés de la surface par laser ou *surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (SELDI-TOF-MS). La surface de la puce est traitée chimiquement (surface hydrophobe, anionique, cationique etc.) ou biochimiquement (immobilisation d'anticorps, de récepteurs, d'enzymes, d'ADN etc.) ce qui permet l'interaction spécifique avec certaines protéines ou groupes de protéines. Après dépôt de l'échantillon sur la puce, les protéines

d'intérêt seront retenues à la surface. L'activation du laser permet ensuite l'irradiation et la désorption/ionisation des protéines, libérant des ions. Le spectromètre de masse à temps de vol (la partie TOF-MS de l'instrument) permet ensuite de mesurer le rapport masse/charge (m/z) des ions à partir de leur vitesse.

Cette technique est surtout appliquée dans le domaine de la protéomique et la découverte de biomarqueurs (Issaq *et al*, 2002; Bischoff & Luidner, 2004). Un des exemples les plus connus est la ProteinChip® de Bio-Rad, détaillée dans la section 2.3 du Chapitre 4.

Contrairement à d'autres méthodes de détection comme la SPR ou l'AFM, la spectrométrie de masse a l'avantage de fournir des informations sur la structure des protéines. Son couplage à d'autres techniques permettrait donc d'approfondir l'analyse protéique. L'équipe de Nedelkov a ainsi démontré la complémentarité de la SPR avec une technique de spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF MS, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*). La puce, sur laquelle sont immobilisées des sondes, est d'abord analysée par SPR grâce à un instrument Biacore pour obtenir des informations quantitatives sur les interactions entre les sondes et les protéines présentes dans les échantillons étudiés. L'analyse par SPR n'étant pas destructive, les analytes interagissant avec les sondes peuvent ensuite être analysés par MALDI-TOF MS. En effet, le support peut facilement être transféré d'un instrument à l'autre. L'analyse MALDI-TOF MS permet ainsi d'obtenir les caractéristiques structurales des analytes. Cette double approche a donc le potentiel de devenir une plateforme de criblage rapide et à haut-débit d'échantillons biologiques pour la fonctionnalité des protéines (Nedelkov & Nelson, 2003a, 2003b). Plus récemment, une plateforme de caractérisation de biomarqueurs a été développée associant l'immunodétection sur un format de puce et par SPR, avec une analyse par spectrométrie de masse. Une étape de digestion enzymatique effectuée directement sur la puce permet l'analyse de fragments peptidiques (Rouleau *et al*, 2012).

4. APPLICATIONS

Les protéines présentent une grande diversité notamment de fonction et de régulation. Les applications des puces à protéines sont donc très variées et concernent de nombreux domaines. Elles peuvent en effet être utilisées pour mesurer des niveaux de protéines ou de petites molécules dans des échantillons biologiques, détecter et analyser des cellules, mesurer des modifications protéiques, déterminer des profils immunologiques, caractériser des interactions protéiques ou encore mesurer des activités enzymatiques (Zangar *et al*, 2005).

Malgré le large champ d'applications des puces à protéines, deux grands domaines se démarquent : la recherche protéomique et le diagnostic *in vitro*. Quelques exemples sont décrits ci-dessous pour chacun de ces domaines.

4.1. RECHERCHE PROTÉOMIQUE

Les études protéomiques ont fortement bénéficié de la technologie des puces à protéines. Ces dernières apportent plusieurs avantages, notamment la possibilité d'étudier simultanément et à haut-débit un très grand nombre de protéines avec un faible volume d'échantillon. C'est donc un outil puissant qui est mis à profit à la fois de la recherche fondamentale et de la recherche clinique.

4.1.1. RECHERCHE FONDAMENTALE

La première « puce à protéome » a été créée en 2001 par Zhu *et al.* et a permis l'étude du protéome de la levure (Zhu *et al.*, 2001). De nouvelles interactions protéiques et activités biochimiques ont ainsi pu être identifiées. Depuis, l'équipe de Zhu a fortement contribué au progrès des puces à protéomes. Elle a notamment construit la première puce pour l'étude du protéome humain, contenant 17 000 protéines et couvrant environ 80% du protéome humain (Hu *et al.*, 2012).

Le format des puces à protéines en phase inverse convient parfaitement à la recherche fondamentale. Leurs applications incluent la compréhension des voies de régulation, la compréhension de la régulation des gènes et de l'expression des protéines par la caractérisation des interactions protéine-acide nucléique ainsi que l'étude des modifications post-traductionnelles (Akbari *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2016). Par exemple, Newman *et al.* ont pu construire une cartographie des réseaux de phosphorylation en connectant des centaines de kinases à leurs substrats. Pour cela, ils ont utilisé des puces à protéines contenant plus de 4 000 protéines humaines dont une partie est connue pour être régulée par phosphorylation (Newman *et al.*, 2013).

4.1.2. IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS

Les technologies à grande échelle et haut-débit telles que la spectrométrie de masse et les puces à protéines ont contribué à l'essor de l'identification de nouveaux biomarqueurs (voir le Chapitre 4). Les puces à protéines sont utilisées pour l'étude à la fois d'antigènes et d'anticorps présents dans le sang ou d'autres échantillons biologiques pour découvrir des éléments informatifs sur une pathologie.

Miller *et al.* ont ainsi pu identifier de potentiels biomarqueurs du cancer de la prostate en étudiant le profil protéique de sérums de patients grâce à une puce à protéines. Trente-trois échantillons de patients et vingt échantillons de contrôle ont été marqués par deux fluorochromes différents et analysés sur une puce contenant plus d'une centaine d'anticorps immobilisés. L'analyse comparative

des deux groupes d'échantillons a permis d'identifier cinq protéines présentes à des niveaux significativement différents chez les patients atteints de cancer de la prostate (Miller *et al*, 2003).

Un autre exemple montre l'utilisation intéressante de plusieurs technologies : des échantillons tissulaires de vessie ont d'abord été analysés sur une puce à ADN pour identifier des gènes surexprimés dans des tumeurs urothéliales. Les anticorps dirigés contre les protéines en lien avec ces gènes ont alors été sélectionnés pour créer des puces à protéines. Le profil protéique de sérums de patients a ensuite été déterminé à l'aide de ces puces (Sanchez-Carbayo *et al*, 2006).

Comme pour la recherche fondamentale, les puces à protéines en phase inverse se montrent très utiles pour la découverte de biomarqueurs. Une revue récente répertorie de nombreux exemples d'identification de biomarqueurs tumoraux grâce à cette méthode, notamment pour le cancer de la prostate, du colon et du pancréas (Nishizuka & Mills, 2015).

4.1.3. IDENTIFICATION DE MÉDICAMENTS OU DE MÉCANISMES THÉRAPEUTIQUES

La recherche pharmaceutique bénéficie également de la technologie des puces à protéines. Celles-ci peuvent être impliquées dans la découverte de candidats-médicaments, de cibles thérapeutiques ou encore dans des études pharmacodynamiques ou de mécanismes d'action.

Une étude a par exemple démontré l'utilité des puces à protéines en phase inverse pour le criblage de candidats-médicaments, des inhibiteurs de kinases. L'action de ces inhibiteurs a été étudiée au niveau des voies de signalisation cellulaire. L'étude s'est portée plus particulièrement sur la phosphorylation de protéines impliquées dans la voie des facteurs de croissance épidermiques (EGF), dont le récepteur (EGFR) est une tyrosine kinase impliquée dans la prolifération des tumeurs (van Oostrum *et al*, 2009).

4.2. DIAGNOSTIC *IN VITRO*

Le diagnostic *in vitro* est une autre application des puces à protéines. Elles sont utilisées pour la détection d'antigènes ou d'anticorps dans des échantillons cliniques comme le sérum.

En allergologie, la puce ImmunoCAP ISAC® commercialisée par Phadia (www.phadia.com) permet la détermination d'IgE dirigées contre 112 allergènes recombinants ou purifiés. La puce se présente sous la forme de lame de verre sur laquelle sont immobilisés les allergènes. Chaque lame contient quatre matrices identiques et peut donc analyser quatre échantillons différents. Le test se fait ensuite en deux étapes : les IgE présentes dans l'échantillon interagissent avec les allergènes immobilisés puis cette interaction est détectée par des anticorps anti-IgE marqués par des fluorochromes (Figure 1-14). ImmunoCAP ISAC® est un test semi-quantitatif puisque les résultats, c'est-à-dire les concentrations d'IgE, sont donnés en unités ISU (*ISAC Standardized Units*) (Gadisseur *et al*, 2011; Cretich *et al*, 2014).

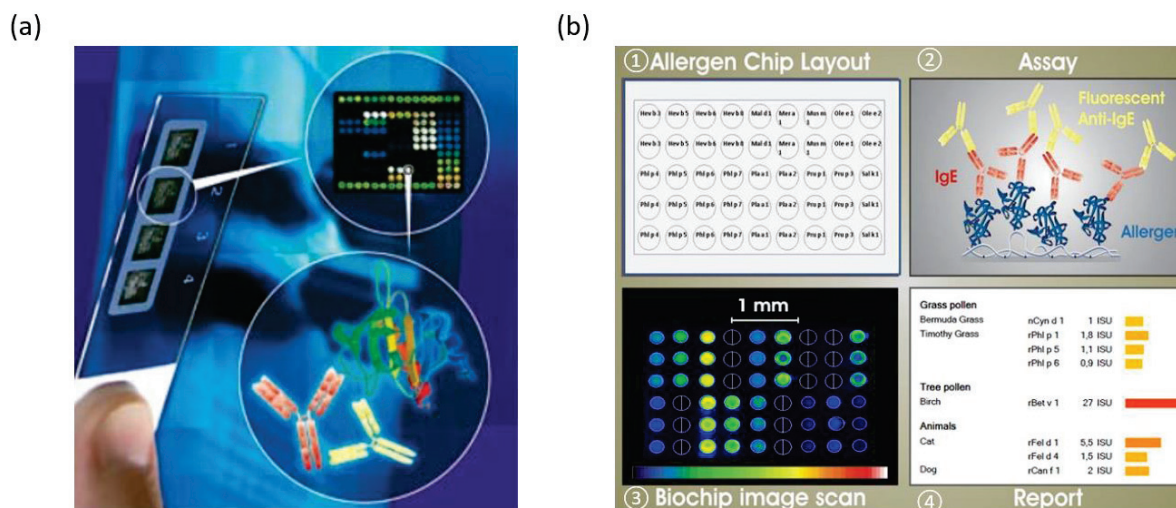


Figure 1-14. Puce ImmunoCAP ISAC® pour le diagnostic de l'allergie (source : www.phadia.com)

(a) Présentation de la puce : lame de verre contenant 4 matrices identiques (b) ① Exemple de matrice d'allergènes ② Principe de l'immunoessai : les allergènes sont liés de façon covalente aux polymères présents sur la lame. Ils interagissent avec les IgE de l'échantillon qui sont ensuite détectées par marquage fluorescent d'anticorps anti-IgE. ③ Image obtenue par mesure de la fluorescence grâce à un scanner ④ Rapport d'analyse

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. Randox commercialise plusieurs tests sous forme de puce pour la détection de biomarqueurs (www.randox.com). Il y a notamment le test Tumeur PSA Array pour le dépistage du cancer de la prostate. Il détecte quantitativement trois marqueurs : l'antigène carcino-embryonnaire (ACE ou CEA, *carcinoembryonic antigen*), le PSA total et le PSA libre. La puce contient une matrice d'anticorps spécifiques aux marqueurs et la détection se fait grâce à un immunoessai de type sandwich avec détection par chimiluminescence.

Les puces à protéines sont cependant encore peu approuvées pour la pratique clinique, leur utilisation est inférieure à celle des puces à ADN. Dans un rapport publié en 2008, la *National Academy of Clinical Biochemistry* (NACB) a émis des recommandations quant à l'utilisation de biopuces en oncologie. Concernant les puces à protéines, elles sont « recommandées comme outils de recherche pour l'analyse multiparamétrique d'un grand nombre de protéines. Le niveau de preuve n'est pas encore suffisant pour des applications cliniques » (Sturgeon *et al*, 2008).

Cette recommandation reflète bien la position actuelle des puces à protéines pour la détection de biomarqueurs. Malgré les nombreuses applications possibles de ces puces, il existe encore un écart considérable entre l'utilisation de puces à protéines pour l'identification de biomarqueurs et la validation de ces puces pour une utilisation clinique (Zangar *et al*, 2006). Les causes de cet écart et les problématiques liées sont développées dans la section suivante.

5. PROBLÉMATIQUES DE CONTRÔLE QUALITÉ ET D'ANALYSE DE DONNÉES DES PUCES À PROTÉINES

Le format particulier des biopuces présente de nombreux avantages, notamment 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 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.

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'y a pas encore de référence (*gold standard*) permettant une comparaison des données entre laboratoires ou entre plateformes.

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 (Ellington *et al*, 2009).

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, par exemple, des plots pour les contrôles positifs et négatifs, des plots de normalisation, de liaison non spécifique ou de réaction croisée. Cependant, la disponibilité de ces types de contrôles n'est pas toujours assurée pour toutes les protéines mesurées par le test (Hamelinck *et al*, 2005; Master *et al*, 2006).

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 alors 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 dont le contrôle qualité est validé. Le développement

d'algorithmes robustes de contrôle qualité semble donc nécessaire (Master *et al*, 2006; Tighe *et al*, 2015).

Le contrôle qualité n'est pas la seule problématique des puces à protéines. Les tests multiparamétriques génèrent une grande quantité de résultats et nécessitent donc une analyse appropriée des données. Élaborer 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 en effet 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 (Ellington *et al*, 2009; Kricka & Master, 2009).

De plus, l'obtention de nombreuses données à partir d'un échantillon de patient met en avant l'aspect éthique de ce genre de tests. Si le nombre de paramètres (analytes) mesurés par le test dépasse les paramètres réellement nécessaires (demandés par le praticien et utilisés pour une situation clinique donnée) qu'en est-il des données « inutiles » ? Il n'existe pour l'instant aucun consensus quant à leur stockage ou leur apparition dans le rapport d'analyse. Cette problématique s'applique cependant uniquement dans les cas de tests multiparamétriques pour lesquels des résultats individuels pour chaque analyte sont édités et ne concernent pas les tests pour lesquels le panel de mesures est utilisé pour générer un seul résultat (un diagnostic par exemple) (Master *et al*, 2006).

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 (Shi, 2006; Ellington *et al*, 2009; MAQC Consortium, 2010). De telles initiatives seraient également bénéfiques pour les puces à protéines.

Chapitre 2. Les plateformes d'immunoessais

1. LA PLATEFORME IDÉALE

Suite à l'initiative *21st Century Bioanalytical Laboratory Platforms* de l'*American Association of Pharmaceutical Scientists*, une équipe de représentants d'industries pharmaceutiques et biotechnologiques a été formée pour formuler un consensus concernant les caractéristiques attendues par les utilisateurs d'une plateforme de bionalyse. Les résultats de leur discussion ont été publiés en 2012 et décrivent les aspects essentiels d'une telle plateforme (Spriggs *et al*, 2012).

Selon cette équipe, une plateforme est définie comme « la technologie utilisée dans une méthode analytique pour traduire un événement biochimique en un signal mesurable » et un instrument comme « un outil utilisé pour mesurer le signal sortant d'une plateforme et convertir ce signal en information interprétable [...] mais peut inclure d'autres aspects tels que l'automatisation de pipetage » (Spriggs *et al*, 2012). Les principales caractéristiques d'une plateforme idéale sont décrites ci-dessous.

1.1. CARACTÉRISTIQUES ANALYTIQUES

Les caractéristiques analytiques d'un immunoessai sont un aspect fondamental. Bien que le format de l'immunoessai et la qualité des réactifs aient une grande influence sur les performances analytiques, le choix de la plateforme est également un facteur majeur. La sensibilité adéquate est sûrement la caractéristique primordiale d'une plateforme d'analyse qui doit pouvoir détecter divers analytes. Une bonne sensibilité est notamment importante pour la détection de biomarqueurs, parfois présents à de faibles concentrations dans l'échantillon.

Un haut niveau de fidélité est également nécessaire. La fidélité représente l'ensemble des caractéristiques de dispersion des mesures comme la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité. Il est généralement reconnu qu'une limite de 20% (en termes de coefficient de variation) est acceptée pour une méthode analytique. Cependant, en comparaison à d'autres méthodes comme la chromatographie, les immunoessais ont intrinsèquement une précision plus faible. Il est donc parfois recommandé d'établir une limite moins restrictive (25% par exemple) (Braggio *et al*, 1996; Findlay *et al*, 2000).

Une autre caractéristique importante est une gamme dynamique étendue. La plateforme doit donc pouvoir générer un signal sur une large gamme. Ceci est d'autant plus important que pour certaines applications, il est nécessaire de détecter des analytes à des concentrations très variées, pouvant aller jusqu'à une différence de 3 log. C'est par exemple le cas des concentrations sanguines d'interleukine 6 (IL6) chez des patients atteints de sepsis qui sont jusqu'à 7 500 fois supérieures à des concentrations normales (Hack *et al*, 1989).

De plus, une plateforme d'immunoessais doit démontrer sa robustesse, c'est-à-dire sa capacité à rester non affectée par des petites variations des conditions opératoires telles que l'humidité, la température ou la durée d'incubation. La robustesse permet ainsi d'assurer des performances concordantes entre laboratoires utilisant la même plateforme. En lien avec cette caractéristique, il est également important que la plateforme présente une certaine tolérance vis-à-vis de l'interférence des matrices biologiques. La présence de certains composants dans la matrice peut, en effet, impacter les performances analytiques en augmentant ou diminuant le signal lié à la détection d'un analyte.

1.2. MULTIPLEXAGE

La mesure de plusieurs analytes à partir d'une seule analyse d'un échantillon est un aspect primordial à prendre en compte lors du développement d'une plateforme. La capacité de multiplexage des méthodes d'analyse est en effet une des demandes actuelles des utilisateurs. Celle-ci permet l'obtention de nombreuses données avec un gain de temps et de coût. Le multiplexage est particulièrement adéquat pour la découverte de biomarqueurs ou encore pour des applications diagnostiques dans le cadre de la médecine personnalisée (Tighe *et al*, 2015).

Néanmoins, le multiplexage ne doit pas être développé aux dépens des caractéristiques analytiques attendues d'une plateforme. Idéalement, l'immunoessai multiparamétrique devrait conserver les performances analytiques de chaque immunoessai individuel. Il faut donc prendre en compte son impact sur la gamme dynamique, la sensibilité mais également la réaction croisée entre les différents réactifs.

1.3. FLEXIBILITÉ ET HAUT-DÉBIT

Du fait de la demande croissante des utilisateurs d'obtenir de nombreuses données de haute qualité avec des ressources diminuées, les plateformes d'immunoessais doivent présenter une certaine flexibilité et permettre un haut-débit. Par exemple, il doit être possible d'utiliser la même plateforme tout au long du cycle de développement d'un médicament : de la découverte des cibles thérapeutiques, au criblage des candidats médicaments et leur validation clinique.

La réduction de l'intervention d'opérateurs humains par l'automatisation de la plateforme est un des facteurs permettant l'augmentation du débit (Ahene *et al*, 2012). L'automatisation permet également d'augmenter la qualité des données grâce à l'amélioration de la fidélité et de la justesse des mesures (Wild, 2005).

La plateforme doit cependant conserver une flexibilité, notamment en termes de compatibilité avec les systèmes automatiques déjà existants dans les laboratoires ou la possibilité d'intégrer des composants automatiques à l'instrument. La flexibilité doit également concerner d'autres aspects tels que le format et la miniaturisation de l'immunoessai.

Une seconde équipe issue de l'initiative *21st Century Bioanalytical Laboratory Platforms* a travaillé spécifiquement sur l'automatisation des plateformes. Leur publication regroupe les exigences attendues de plateformes automatisées et définit les lacunes actuelles qui empêchent le développement total de l'automatisation (Ahene *et al*, 2012). Il existe, par exemple, un manque de standardisation des interfaces. Idéalement, les utilisateurs voudraient choisir les composants de leur plateforme, provenant de différents fournisseurs pour pouvoir les assembler et les connecter à un ordinateur central puis être capable de réaliser un essai grâce à un logiciel de communication entre les différents composants tout en nécessitant peu d'ajustement (Figure 2-1). Leur demande s'apparente donc aux systèmes *plug-and-play* qui existent déjà dans d'autres industries.

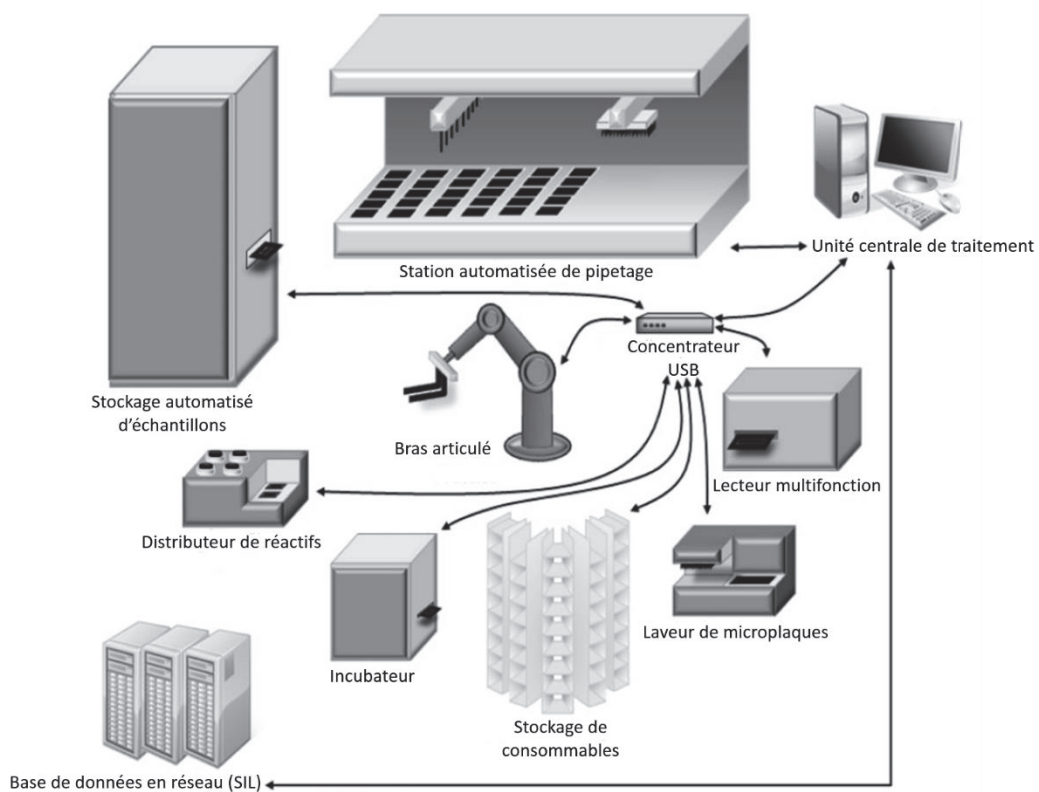


Figure 2-1. Représentation schématique d'un système automatisé d'immunoessais (adapté de Ahene *et al*, 2012)
SIL, système de gestion des informations de laboratoire

1.4. CARACTÉRISTIQUES DE L'INSTRUMENT

Outre l'automatisation, l'instrument utilisé (ou l'ensemble d'instruments) pour une plateforme idéale doit posséder d'autres caractéristiques. Il doit notamment être facile d'utilisation, nécessiter peu de formation et un temps d'installation court. Comme pour la plateforme elle-même, on retrouve le besoin de flexibilité de l'instrument. La création de nouveaux protocoles doit, en effet, être facilement réalisable pour permettre d'optimiser la performance de l'immunoessai en ajustant certains paramètres physiques ou fonctionnels. Concernant ses caractéristiques physiques, un instrument de taille modérée et pouvant être installé sur une paillasse est souvent préférable. Enfin, d'autres aspects ont été mis en avant par les utilisateurs tels que l'importance du logiciel et de sa facilité de validation, la maintenance et la disponibilité d'un service après-vente.

Les principales caractéristiques attendues d'une plateforme idéale sont résumées dans le Tableau 2-1.

Tableau 2-1. Principales caractéristiques d'une plateforme d'immunoessais idéale (adapté de Spriggs et al, 2012)

Caractéristiques d'une plateforme idéale	Description
Sensibilité	Dépend de l'utilisation de la plateforme Possibilité de quantifier des concentrations faibles d'analytes dans diverses matrices
Fidélité	Limite de 20 à 25% de variation
Gamme dynamique	Étendue (jusqu'à 3 log)
Robustesse	Performances stables sous différentes conditions de laboratoire Tolérance vis-à-vis de l'interférence des matrices biologiques
Multiplexage	Capacité de multiplexage importante Réaction croisée minimale
Flexibilité et haut-débit	Automatisation compatible Possibilité de miniaturisation de l'essai Possibilité d'utilisation de la même plateforme tout au long du cycle de développement d'un médicament/biomarqueur
Instrument automatisé et flexible	Système <i>plug-and-play</i> Utilisation facile

2. VALIDATION DES IMMUNOESSAIS EN MULTIPLEXE

La validation analytique des immunoessais doit être effectuée avant la validation clinique du test. Plusieurs recommandations et lignes directrices ont été publiées à ce sujet. Bien que ces dernières n'intègrent que rarement l'aspect multiplexe d'un immunoessai, elles peuvent s'appliquer à un test qui présente des capacités de multiplexage. Elles ne sont cependant pas toujours suffisantes pour une validation complète car le multiplexage apporte des difficultés supplémentaires telles que la réaction croisée.

2.1. PERSPECTIVE DE L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

L'intérêt pour la standardisation des méthodes d'analyse biologique et leur validation a débuté dans les années 1990 et a permis les premières publications de lignes directrices, notamment sur les aspects statistiques d'une validation et l'utilisation d'échantillons de contrôle qualité. Les paramètres essentiels de performance d'une méthode analytique ont alors été définis et incluent la justesse (étroitesse d'accord entre une valeur obtenue et une valeur de référence considérée comme exacte), la fidélité, la sélectivité, la sensibilité et la stabilité. L'importance de la gamme d'étalonnage et des critères d'acceptation des contrôles qualité a également été établie (Shah, 2007).

Néanmoins, les problématiques relatives aux méthodes d'immunoessais n'étaient pas suffisamment abordées, comme le montre la proposition de guide de l'agence américaine FDA (*Food and Drug Administration*) de 1999 sur la validation des méthodes d'analyse biologique qui ne mentionne que brièvement les immunoessais (Hill, 2000). Des représentants de l'industrie pharmaceutique ont ainsi décidé d'étudier les questions propres à la validation d'immunoessais et de publier des recommandations quant à cette validation (Findlay *et al*, 2000).

La Figure 2-2 résume les étapes de validation recommandées par les auteurs. Il y a tout d'abord une étape dite de pré-validation qui correspond au développement de l'immunoessai. La deuxième étape est la validation elle-même. Elle permet d'établir les caractéristiques analytiques de l'immunoessai en accord avec les exigences de l'utilisateur. Du fait de certaines particularités des immunoessais par rapport à d'autres méthodes d'analyse, les auteurs ont relevé plusieurs points à prendre en compte particulièrement. Cela concerne notamment les gammes d'étalonnage qui ne sont pas linéaires. Il est donc nécessaire de sélectionner un modèle approprié pour décrire les données, la régression logistique à quatre paramètres étant souvent le modèle le plus adapté. Un autre point important est le choix des limites de critères d'acceptation. En effet, du fait de la réaction entre un analyte et un réactif biologique (l'anticorps), les immunoessais présentent une plus faible précision par rapport à d'autres méthodes analytiques dépendant des propriétés chimiques ou physico-chimiques des

molécules telle que la chromatographie. C'est pour cette raison que les auteurs recommandent une limite de 25% pour la justesse et la fidélité, au lieu de la limite de 20% généralement appliquée aux autres méthodes. Enfin la dernière étape correspond à la mise en œuvre de l'immunoessai. Il est alors possible de valider d'autres paramètres tels que le parallélisme (comparaison de la courbe d'étalonnage à la courbe de dilution de l'échantillon). Comme le montre la Figure 2-2, il est important de considérer les diverses étapes de développement de validation comme un continuum.

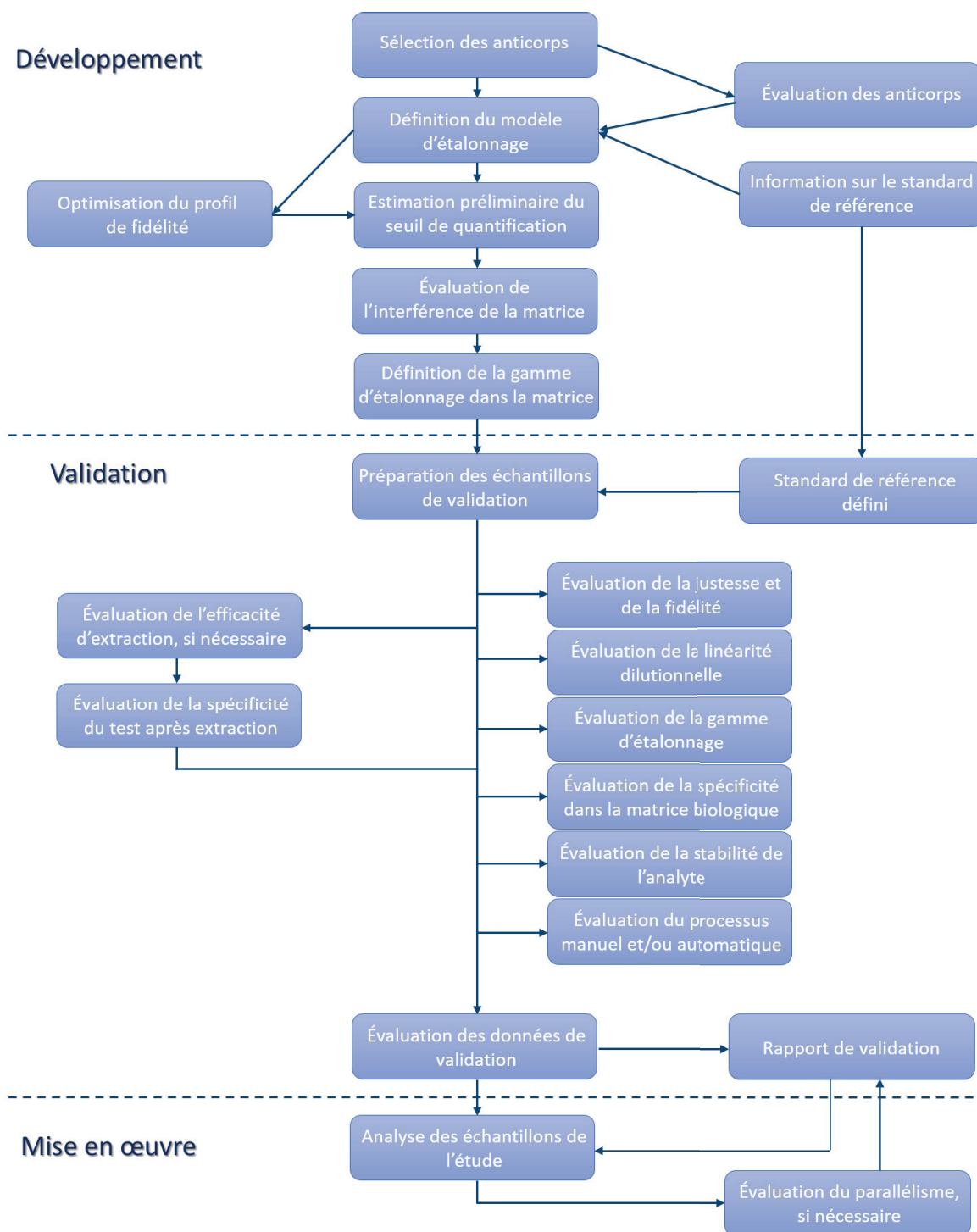


Figure 2-2. Représentation schématique des étapes de validation d'un immunoessai (adapté de Findlay et al, 2000)

Ces recommandations ont démontré leur utilité pour la validation d'un immunoessai multiparamétrique. En effet, Ray *et al.* ont suivi les lignes directrices de Findlay *et al.* pour la validation de leur test, un immunoessai pour la détermination simultanée de cinq cytokines dans le sérum humain (Ray *et al.*, 2005). L'évaluation de la fidélité a par exemple démontré un coefficient de variation inférieur à 25% pour chaque analyte, celui-ci variant de 11,3% à 24,2%.

2.2. RECOMMANDATIONS EUROPÉENNES ET FRANÇAISES

L'Agence européenne des médicaments (EMA, *European Medicines Agency*) a récemment publié un guide présentant les lignes directrices pour la validation d'une méthode d'analyse biologique (European Medicines Agency, 2011). Ce guide est axé sur la validation des méthodes bioanalytiques générant des données quantitatives utilisées en pharmacocinétique et toxicocinétique. Néanmoins, les méthodes de validation décrites peuvent généralement s'appliquer à d'autres contextes d'analyse biologique.

De plus, il est intéressant de noter qu'une section entière du guide est consacrée aux immunoessais. Une fois de plus, les particularités des immunoessais en termes de validation sont mises en avant. Les principaux généraux du guide s'appliquent aux immunoessais mais l'EMA émet des recommandations spécifiques similaires à celles décrites par Findlay *et al.*.

Concernant les analyses biologiques, l'étendue d'une validation de méthode dépend des applications envisagées du test. En effet, un immunoessai utilisé en recherche et développement ne nécessite pas une validation complète tandis que des tests pour la validation clinique d'un médicament ou pour le diagnostic *in vitro* devront subir une validation complète avant l'analyse des échantillons de l'étude.

En santé humaine et au niveau national, la validation des méthodes en biologie médicale est une des exigences d'accréditation des laboratoires de biologie médicale. L'accréditation, dont l'objectif est de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale, devient obligatoire au 1^{er} novembre 2016 pour tout laboratoire public et privé de France. Elle est délivrée par le Comité français d'accréditation (COFRAC) et repose sur une norme européenne harmonisée : NF EN ISO 15189.

La validation de méthode est donc nécessaire pour le passage en routine d'une nouvelle technique de dosage d'un laboratoire de biologie médicale. Le COFRAC a publié un guide technique d'accréditation de vérification et de validation de méthodes qui décrit toutes les étapes du processus (COFRAC, 2015). Deux portées sont distinguées : la validation de méthode en portée A concerne les méthodes reconnues et correspond à une vérification des performances du système analytique lors de la mise en routine dans le laboratoire tandis que la validation de méthode en portée B concerne les méthodes adaptées ou développées en interne. Dans ce cas, le laboratoire évalue l'ensemble des critères de

qualité de la méthode susceptibles d'en démontrer la maîtrise. Le Tableau 2-2 résume les performances à évaluer lors d'une vérification (portée A) et d'une validation (portée B). Ces critères sont très similaires à ceux proposés par *Findlay et al.*.

Tableau 2-2. Résumé des performances à évaluer lors d'une vérification/validation de méthode quantitative ou qualitative (extrait de COFRAC, 2015)

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
<i>Fidélité</i> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
<i>Justesse/exactitude</i> (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
<i>Incertitudes/facteurs de variabilité</i> et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
<i>Comparaison</i> avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir, EBMD) et analyse des discordances	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure (<i>Limite de quantification et limites de linéarité</i>)	Bibliographie	/	Essai	/
<i>Interférences</i> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<i>Contamination</i> entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<i>Robustesse</i>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<i>Stabilité réactifs</i> (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<i>Intervalle de référence</i> (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
<i>Limite de détection</i>	/	Bibliographie	/	Essai
<i>Spécificité/sensibilité analytique</i>	/	Bibliographie	/	Essai

EBMD, examen de biologie médicale délocalisé

2.3. RECOMMANDATIONS POUR LA VALIDATION D'IMMUNOESSAIS POUR BIOMARQUEURS

Les immunoessais pour la détermination de biomarqueurs présentent des particularités qui nécessitent une méthode de validation plus particulière. Les problématiques liées à la détection de biomarqueurs incluent l'absence de matériel de référence approprié, le besoin de réactifs et de plateformes analytiques uniques et la présence de biomarqueurs endogènes dans la matrice biologique (Valentin *et al*, 2011). Ainsi, certains principes généraux de validation de méthode ne peuvent s'appliquer directement à ce type d'immunoessais. En 2003, un séminaire de l'*American Society of Pharmaceutical Sciences* et de la *Clinical Ligand Assay Society* a abordé les questions clés des biomarqueurs, particulièrement la validation et la mise en routine de méthodes de dosage de ces derniers (Lee *et al*, 2005). La publication qui a suivi ce séminaire recommande une approche de validation adaptée à l'usage prévu de l'immunoessai et définit les éléments essentiels de la validation :

la stabilité de l'échantillon, la préparation des standards d'étalonnage, les contrôles qualité, la définition de la gamme dynamique, la sélectivité, la fidélité et la justesse (Lee *et al*, 2006).

Cependant, depuis ce rapport de 2006, il y a peu de publications pour l'établissement de lignes directrices de validation des immunoessais pour biomarqueurs. Une proposition détaillée de méthode de validation spécifique à ces immunoessais n'a été publiée que récemment (Valentin *et al*, 2011). Cette dernière décrit quatre étapes clés :

1. Étude de faisabilité : la faisabilité doit être évaluée avant la validation. Elle permet de s'assurer que le test est en mesure d'atteindre l'objectif visé. L'étude de faisabilité évalue les performances de l'immunoessai, dont la sélectivité et la reproductibilité, en utilisant des échantillons biologiques. Un élément clé de cette étape est l'évaluation du parallélisme. En effet, le standard de référence utilisé pour établir la gamme d'étalonnage n'est pas parfaitement représentatif du marqueur endogène. C'est donc une quantité relative de marqueur endogène qui est mesurée avec cette gamme d'étalonnage, basée sur des hypothèses quant à la justesse du test. Il est important de tester ces hypothèses grâce au parallélisme qui doit démontrer que la relation entre la concentration et la réponse du biomarqueur dans la matrice de l'échantillon est suffisamment similaire à celle du standard de référence dans sa matrice.
2. Prise de décision : à la fin de l'étude de faisabilité, les résultats de performance permettent de déterminer s'il est possible de passer à l'étape de validation ou si des modifications sont nécessaires.
3. Définition des contrôles qualité : avant la validation, il est nécessaire d'établir les valeurs théoriques des échantillons de contrôle qualité. Ceux-ci doivent être préparés dans la matrice biologique appropriée. Ils se distinguent des standards de référence et ne doivent pas être utilisés pour établir la gamme d'étalonnage.
4. Validation : c'est la démonstration des performances de l'immunoessai, notamment selon les critères d'acceptation de justesse et de fidélité. Elle inclut également l'évaluation de la stabilité des biomarqueurs dans la matrice biologique.

Les auteurs font la distinction entre deux types de biomarqueurs : les biomarqueurs considérés comme des critères de jugements associés à des études exploratoires et les biomarqueurs considérés comme des critères de jugement principaux d'essais cliniques. Ces derniers sont impliqués dans la prise de décision clinique et leur validation de méthode est donc plus rigoureuse. Les paramètres évalués lors de la validation et les différences de validation entre ces deux types de marqueurs sont résumés dans le Tableau 2-3.

De nouveau, les auteurs ont pris en compte les particularités des immunoessais pour proposer des critères d'acceptation moins stricts que pour d'autres méthodes d'analyse. Ceci est d'autant plus applicable à des dosages de biomarqueurs puisque le matériel de référence utilisé pour la gamme d'étalonnage n'est pas réellement représentatif du marqueur endogène ; il s'agit donc d'une quantification relative.

Enfin, ce plan de validation des immunoessais pour biomarqueurs a été appliqué avec succès à plusieurs types de plateformes tels que l'ELISA classique monoparamétrique mais également des plateformes multiparamétriques en format planaire ou en suspension (Valentin *et al*, 2011).

Tableau 2-3. Résumé des paramètres à évaluer lors d'une validation d'immunoessai pour biomarqueurs (adapté de Valentin et al, 2011)

Paramètres	Biomarqueurs pour études exploratoires		Biomarqueurs pour essais cliniques	
	Évaluation	Critères d'acceptation	Évaluation	Critères d'acceptation
Gamme d'étalonnage		<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 6 standards différents de 0 • Justesse moyenne : 80-120% • CV : ≤ 20% • ≥ 75% des standards doivent répondre aux CA 		
	<ul style="list-style-type: none"> • Les standards des valeurs seuils de quantification supérieure et inférieure doivent répondre aux CA 			
Fidélité et justesse intra- et inter-essai	<ul style="list-style-type: none"> • 3 niveaux de CQ • 3 essais indépendants et 5 préparations indépendantes par niveau de CQ 	<ul style="list-style-type: none"> • Justesse moyenne : 70-130% • CV ≤ 25% • Par niveau de CQ : 4/5 déterminations de niveau doivent répondre aux CA 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 niveaux de CQ • 6 essais indépendants et 5 préparations indépendantes par niveau de CQ 	<ul style="list-style-type: none"> • Justesse moyenne : 75-125% • CV ≤ 25% • Par niveau de CQ : 4/5 déterminations de niveau doivent répondre aux CA
Parallélisme		NA	6 échantillons biologiques (plusieurs dilutions par échantillon)	<ul style="list-style-type: none"> • Justesse moyenne : 75-125% en comparaison à l'échantillon non dilué • CV ≤ 25% • Pour chaque facteur de dilution, au moins 5 des 6 échantillons répondent aux CA
Sélectivité		NA	6 échantillons biologiques utilisés pour le parallélisme enrichis avec une quantité connue de matériel de référence (plusieurs dilutions par échantillon)	<ul style="list-style-type: none"> • Justesse moyenne : 75-125% en comparaison à l'échantillon non dilué • CV ≤ 25% • Pour chaque facteur de dilution, au moins 5 des 6 échantillons répondent aux CA
Linéarité dilutionnelle		NA	3 échantillons au minimum	<ul style="list-style-type: none"> • Recouvrement moyen : 75-125% • CV ≤ 25% • 2 des 3 échantillons doivent répondre aux CA
Spécificité de l'anticorps		NA	3 échantillons au minimum (enrichis avec une quantité connue d'une protéine similaire au biomarqueur)	<ul style="list-style-type: none"> • Recouvrement moyen : 75-125% • CV ≤ 25% • 2 des 3 échantillons doivent répondre aux CA
Stabilité à court terme	<ul style="list-style-type: none"> • 2 échantillons biologiques • 3 préparations indépendantes par échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> • Recouvrement moyen : 70-130% (comparaison à la mesure du jour 0) • CV ≤ 25% • Au moins 4 des 6 échantillons doivent répondre aux CA 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 échantillons biologiques • 3 préparations indépendantes par échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> • Recouvrement moyen : 75-125% (comparaison à la mesure du jour 0) • CV ≤ 25% • Au moins 4 des 6 échantillons doivent répondre aux CA
Stabilité à long terme		NA	<ul style="list-style-type: none"> • 2 échantillons biologiques • 3 préparations indépendantes par échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> • Recouvrement moyen : 75-125% (comparaison à la mesure du jour 0) • CV ≤ 25% • Au moins 4 des 6 échantillons doivent répondre aux CA

CA, critères d'acceptation ; CQ, contrôle qualité ; CV, coefficient de variation

2.4. LA RÉACTION CROISÉE, UN OBSTACLE AU MULTIPLEXAGE

Comme cela a été démontré à plusieurs niveaux, le développement d'un immunoessai en multiplexe nécessite une validation rigoureuse de sa configuration et de ses performances analytiques. Cependant, il existe encore des contraintes propres à la technologie des dosages multiplexes et l'un des plus gros défis est de maintenir une spécificité élevée.

En effet, l'utilisation simultanée de plusieurs réactifs tels que les anticorps peut entraîner des réactions croisées par interactions non spécifiques entre les différents réactifs et les analytes. Selon l'interaction mise en jeu, la réaction croisée peut avoir un impact sur le signal final de l'immunoessai. Ce phénomène est pourtant peu étudié lors du développement d'un dosage multiplexe et son évaluation n'est pas (ou peu) proposée dans les plans de validation d'immunoessais en multiplexe.

L'équipe de D. Juncker a travaillé sur cette problématique, notamment pour les immunoessais multiplexes en format sandwich. Ce format est reconnu pour limiter la réaction croisée car il implique une liaison de l'analyte sur deux épitopes distincts : l'anticorps de capture permet d'immobiliser et de concentrer l'analyte puis la liaison de ce dernier avec l'anticorps de détection permet la transduction de la double reconnaissance de l'analyte en un signal détectable. Néanmoins, le multiplexage des immunoessais de type sandwich a fait apparaître de nouveaux types de réaction croisée du fait de l'utilisation d'un mélange d'anticorps de détection.

L'équipe de Juncker a alors défini les différents types de réaction croisée possibles entre les anticorps de détection, les analytes et les anticorps de capture (Juncker *et al*, 2014). Les interactions possibles sont décrites dans la Figure 2-3. Ils ont déterminé que le nombre d'interactions, par paire et en prenant en compte chaque scénario (Figure 2-3 b), augmente de façon proportionnelle au nombre de cibles N selon la formule : $4N(N-1)$. Cette formule permet d'estimer une nouvelle mesure nommée vulnérabilité par les auteurs. Elle ne prend cependant pas en compte les interactions entre anticorps de capture, possibles dans des formats en suspension (mais pouvant être négligeables selon la taille des microsphères). Le nombre d'interactions possibles serait alors augmenté et suivrait la formule suivante : $9N(N-1)/2$ (Pla-Roca *et al*, 2012).

Il est également important de noter que les conséquences d'une réaction croisée sont différentes selon le type d'interaction. En effet, certaines réactions croisées vont aboutir à la génération d'un signal faux-positif (par exemple, le scénario (ii) de la Figure 2-3) tandis que d'autres ne généreront pas de signal mais pourront augmenter le bruit de fond et donc diminuer la sensibilité du test (par exemple, si une autre protéine interagit avec l'anticorps de capture mais pas avec un anticorps de détection).

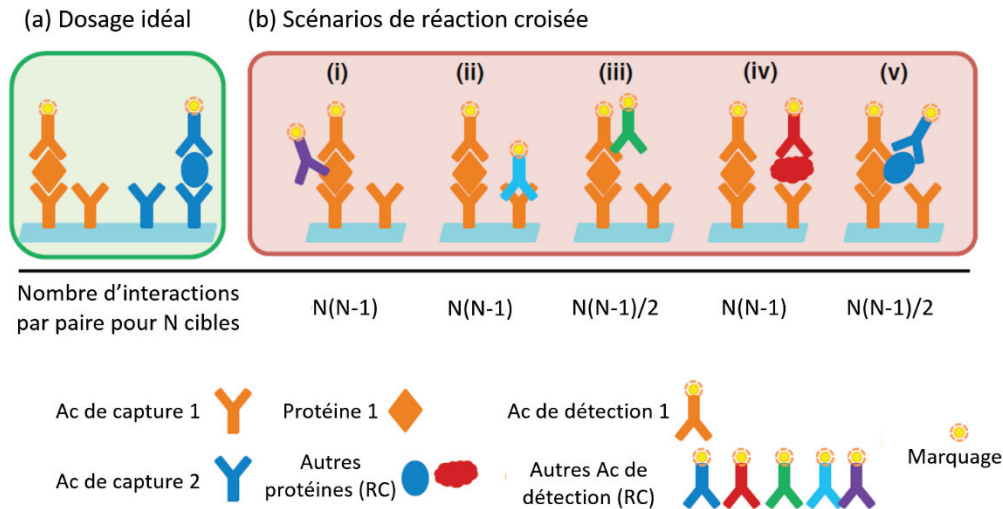


Figure 2-3. Scénarios de réaction croisée d'un immunoessai multiparamétrique et en format sandwich (adapté de Juncker et al, 2014) (a) Un essai idéal sans réaction croisée (b) Scénarios possibles de réaction croisée : (i) Ac de détection avec la protéine cible (ii) Ac de détection avec l'Ac de capture (iii) Ac de détection avec l'Ac de détection (iv) autre protéine mesurée dans le test avec l'Ac de capture (v) autre protéine mesurée dans le test avec la protéine cible. Ac, anticorps ; RC, réaction croisée

Il a été démontré la possibilité d'évaluer toutes les sources de réaction croisée grâce à plusieurs tests. La liaison non spécifique d'antigènes peut être détectée pour le criblage des antigènes individuels en présence de tous les anticorps du test. Inversement, on peut également évaluer individuellement les anticorps de détection en présence de tous les analytes. Cette évaluation permet notamment de détecter les interactions (ii), (iv), et (v) de la Figure 2-3. Enfin, les tests « X-1 » consistent à réaliser, pour un immunoessai comprenant un multiplexage de valeur X, des analyses avec différents mélanges de réactifs, chaque mélange manquant un réactif différent. Ceci peut être réalisé pour les anticorps de détection et pour les analytes. Ce type de criblage permet de mesurer la contribution des combinaisons de réactifs au signal d'un immunoessai individuel (Gonzalez *et al*, 2008).

La qualité des anticorps sélectionnés pour un immunoessai est un aspect important pour maîtriser les réactions croisées. Cependant elle n'est souvent pas suffisante, notamment pour les multiplexages élevés. Ainsi, de nouvelles stratégies ont été développées pour minimiser le phénomène de réaction croisée. La technique de ligature de proximité, *proximity ligation assay* (PLA), est une approche permettant la détection des interactions spécifiques. Pour cela, chaque paire d'anticorps de l'immunoessai de type sandwich est liée à des brins d'ADN. Lorsque la paire d'anticorps interagit simultanément avec l'analyte, il y a ligature des deux brins d'ADN grâce à une réaction enzymatique puis amplification par PCR grâce à des amorces spécifiques et enfin quantification par une PCR en temps réel (Lundberg *et al*, 2011). Grâce à cette technique, Lundberg *et al*. ont pu augmenter le multiplexage de leur test de 9 à 24 analytes sans diminuer sa spécificité.

Une autre stratégie pour minimiser la réaction croisée est de séparer temporellement ou spatialement les réactifs. Poetz *et al.* ont démontré qu'il était possible d'analyser un échantillon de façon séquentielle. Ils utilisent des microsphères magnétiques sur lesquelles sont immobilisés les anticorps de capture. L'échantillon est mis en contact avec une population de microsphères dans un puits puis cette dernière est transférée dans un autre puits dans lequel la suite de l'analyse se produit (incubation avec les anticorps de détection, marquage et détection). L'échantillon présent dans le premier puits peut ainsi être mis en contact avec une nouvelle population de microsphères pour la détection d'un deuxième analyte selon le même procédé. Le nombre d'étapes séquentielles et donc le multiplexage peuvent cependant être limités par des aspects d'ordre pratique, notamment l'augmentation du temps d'analyse lorsque le nombre d'échantillons augmente (Poetz *et al*, 2010).

Enfin, l'équipe de Juncker a mis au point une méthode de séparation spatiale des réactifs : la colocalisation d'anticorps. Les anticorps de capture sont immobilisés sur la puce et leurs coordonnées précises sont enregistrées. Il y a ensuite incubation de l'échantillon puis les anticorps de détection sont à leur tour déposés sur la puce aux mêmes coordonnées que les anticorps de capture (Figure 2-4, a). Les auteurs ont validé ce concept en comparant la méthode à un test ELISA classique et à une puce à protéines classique en format sandwich. Ils ont également pu prouver la capacité de multiplexage de cette méthode en réalisant un test comprenant 50 cibles. Aucune réaction croisée mettant en jeu les anticorps n'a été observée puisque chaque anticorps de détection n'est mis en contact qu'avec son anticorps de capture correspondant (Pla-Roca *et al*, 2012). Néanmoins, tous les scénarios possibles de réaction croisée ne sont pas évités par cette méthode. Il est toujours possible, par exemple, qu'une protéine, présente dans l'échantillon, interagisse de façon non spécifique avec un anticorps de capture puis qu'elle soit détectée par l'anticorps de détection. C'est une situation peu probable puisque cette protéine doit être capable d'interagir avec ces deux anticorps à la fois.

Ce protocole demande un équipement complexe permettant l'alignement précis des plots d'anticorps et l'utilisation de l'automate de dépôt pendant l'analyse, ce qui peut sembler fastidieux. Ainsi, les auteurs ont développé un autre système pour dissocier le protocole d'analyse des étapes de dépôt d'anticorps (Li *et al*, 2012). Pour cela, deux lames sont utilisées : les anticorps de capture sont déposés sur une lame d'essai pour former des plots et les anticorps de détection sont déposés en gouttelettes (8 nL) sur une lame de transfert, en alignement à la lame d'essai. Après l'incubation de la lame d'essai avec l'échantillon, une méthode dite de *snapping* est utilisée pour transférer les anticorps de détection sur la lame d'essai : les deux lames sont insérées dans un appareil qui les met en contact tout en respectant l'alignement (Figure 2-4, b). Les immunoessais multiparamétriques réalisés avec cette technique ont montré des limites de détection similaires à celles des tests ELISA classiques, de l'ordre du pg/mL. De plus, l'appareil portatif de *snapping* permet une utilisation facile.

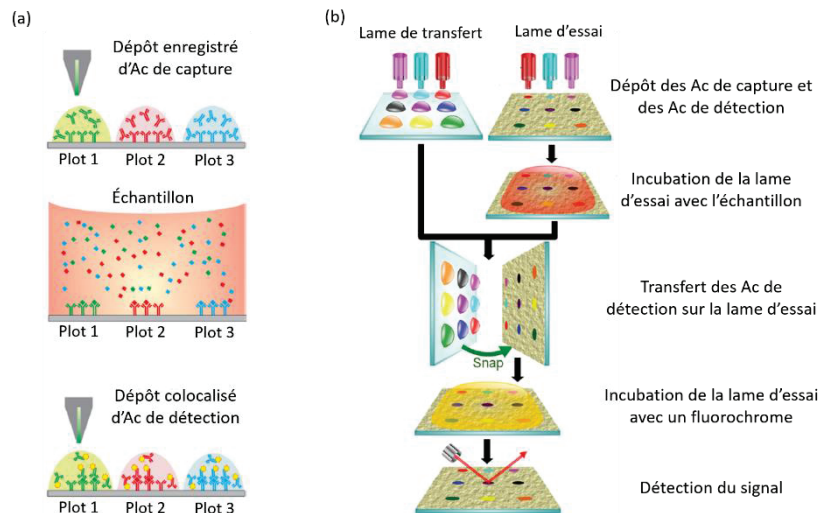


Figure 2-4. Concept de colocalisation d'anticorps (adapté de Li et al, 2012; Pla-Roca et al, 2012).

(a) Protocole de colocalisation d'anticorps par dépôts des anticorps sur les mêmes plots (b) Autre protocole de colocalisation par transfert des réactifs puce à puce. Ac, anticorps

En conclusion, la réaction croisée ne doit pas être négligée lors de l'évaluation d'un immunoessai multiparamétrique. La validation analytique d'un tel test est similaire à celle d'un immunoessai monoparamétrique (plus ou moins approfondie selon l'application du test) mais doit également comprendre une étude de la réaction croisée des différents réactifs.

3. EXEMPLES DE PLATEFORMES

Il existe plusieurs plateformes d'immunoessais multiparamétriques disponibles sur le marché. Quelques exemples de plateformes en format en suspension et en format planaire sont décrits dans cette section.

3.1. PLATEFORMES EN FORMAT EN SUSPENSION

Trois plateformes basées sur les microsphères dominent le marché : la technologie xMAP® de Luminex (www.luminexcorp.com), la technologie BD™ Cytometric Bead Array (BD CBA) de Becton Dickinson Biosciences (www.bdbiosciences.com) et la technologie VeraCode™ d'Illumina (www.illumina.com).

3.1.1. TECHNOLOGIE xMAP®

La technologie xMAP® (*Multi-Analyte Profiling*) de Luminex utilise des microsphères contenant une proportion définie de deux fluorochromes émettant une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm). Jusqu'à 100 populations différentes de microsphères peuvent alors être produites. Il est ensuite possible de conjuguer chaque population à une molécule de capture différente. Quant aux molécules de détection, elles sont conjuguées à un fluorochrome émettant une fluorescence verte.

Ainsi, deux lasers sont utilisés pour la détection multiplexe : le laser rouge (630 nm) permet l'identification de la microsphère et le laser vert (532 nm) permet l'identification de l'interaction avec l'analyte et sa quantification.

Le système Luminex® 100/200™ permet de mesurer simultanément jusqu'à 100 analytes et est compatible avec divers formats de tests dont les immunoessais. Il combine trois technologies : les microsphères xMAP®, l'analyseur Luminex® 100/200™ (basé sur la cytométrie en flux) et le logiciel xPONENT® pour l'acquisition et l'analyse de données. Plus récemment, Luminex a développé un nouvel instrument : FLEXMAP 3D®. Ce système permet une meilleure capacité de multiplexage par l'utilisation de trois fluorochromes discriminant jusqu'à 500 populations de microsphères. La technologie xMAP® offre donc la plus grande capacité de multiplexage des immunoessais en suspension. Néanmoins, elle nécessite des instruments spécifiques pour l'analyse. Leur coût peut limiter l'utilisation de la technologie. Luminex propose une solution moins coûteuse, le système MAGPIX®, dont la détection se fait par une caméra CCD. Ce système possède une capacité de multiplexage de 50 analytes.

La technologie xMAP® est compatible avec de nombreuses applications et plusieurs sociétés ont développé leurs propres immunoessais multiparamétriques avec les microsphères xMAP®. Bio-Rad propose par exemple des immunoessais BioPlex® pour la détection de molécules telles que les cytokines et les facteurs de croissance et des panels spécifiques à certaines pathologies tels que le cancer, le diabète ou des maladies immunitaires (Houser, 2012). D'autres exemples sont décrits dans le Tableau 2-4.

Tableau 2-4. Exemples de tests utilisant la technologie xMAP®

Société	Système/Test	Applications
Affymetrix/eBioscience (www.ebioscience.com)	Procarta®	Cytokines, chimiokines, facteurs de croissance
Bio-Rad (www.bio-rad.com)	BioPlex®	Cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, panels de marqueurs pour les maladies auto-immunes et les maladies infectieuses
Indoor Biotechnologies (www.inbio.com)	MARIA® (<i>Multiplex Array for Indoor Allergens</i>)	Allergie
Invitrogen/ThermoFisher Scientific (www.thermofisher.com)	Invitrogen™ multiplex assay kits	Cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, kinases
EMD Millipore (www.emdmillipore.com)	MILLIPLEX®	Métabolisme osseux, biomarqueurs tumoraux, immunologie, signal cellulaire, endocrinologie, neuroscience, toxicité
R&D Systems (www.rndsystems.com)	Luminex® Screening and Performance Assays	Cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, panels de marqueurs pour les maladies auto-immunes et les maladies infectieuses, marqueurs tumoraux, marqueurs cardiaques

3.1.2. TECHNOLOGIE CBA

Une plateforme similaire à celle de Luminex a été développée par Becton Dickinson Biosciences : le système BD™ Cytometric Bead Array (CBA). Tout comme les microsphères xMAP®, les microsphères de ce système contiennent un fluorochrome à des intensités différentes qui permettent la détection de multiples analytes. La fluorescence est également détectée par cytométrie en flux. L'utilisation d'un seul fluorochrome limite cependant la capacité de multiplexage : jusqu'à 30 analytes peuvent être mesurés simultanément, ce qui est loin de la centaine d'analytes revendiquée par Luminex (Tighe *et al*, 2013). Néanmoins, le système BD™ CBA présente l'avantage d'être compatible avec tout cytomètre équipé d'un laser à 488 nm. Les immunoessais de cette plateforme peuvent donc être réalisés sur de nombreux cytomètres en flux de paillasse (He, 2012). Becton Dickinson Biosciences commercialise plusieurs trousse pour la détection et la quantification de protéines, notamment des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des immunoglobulines humaines.

3.1.3. TECHNOLOGIE VERACODE™

Cette troisième plateforme a un principe différent des deux premières. Le support de l'immunoessai est composé de microparticules cylindriques en verre de 240 µm de long et d'un diamètre de 28 µm. Les microparticules ne contiennent pas de fluorochromes mais sont associées à un composant holographique. Le balayage de ce dernier par un faisceau laser produit un motif de raies sombres et brillantes sous la forme d'un code-barres binaire détecté par caméra CCD. Ce code-barres permet alors l'identification de chaque population de microparticules (Figure 2-5). La détection des interactions mises en jeu lors de l'immunoessai se fait par fluorescence. À la fin de l'analyse, les particules sont transférées dans le lecteur BeadXpress qui les aligne avant de les lire. Deux lasers sont alors utilisés : un laser pour l'identification des microparticules et un deuxième laser pour la détection de la fluorescence de l'immunoessai (Birtwell & Morgan, 2009).

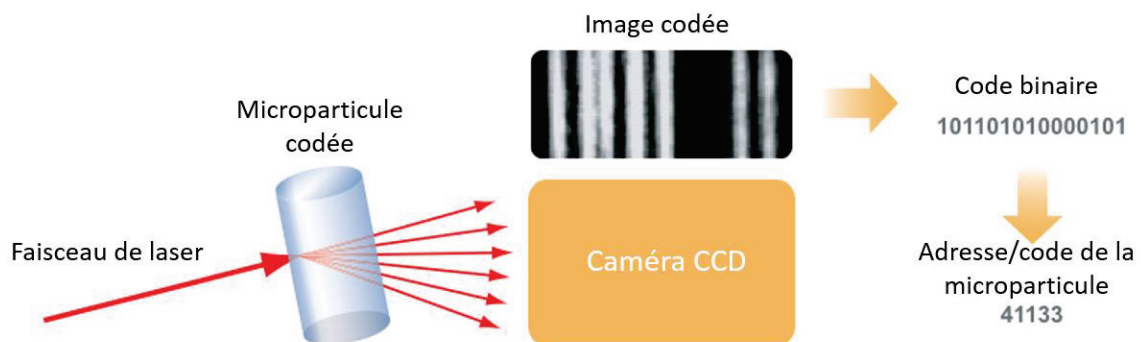


Figure 2-5. Principe de la technologie VeraCode™ (adapté de www.illumina.com). CCD, dispositif à transfert de charge

Cette technologie était initialement destinée à des applications génomiques. Illumina propose des particules avec des oligonucléotides pour le génotypage mais elle fournit également des microparticules carboxylées pour l'immobilisation de diverses sondes et la réalisation d'essais sur mesure. Ainsi, Ostendorff *et al.* ont utilisé la technologie VeraCode™ pour développer une méthode combinant un immunoessai de type sandwich pour la détection de biomarqueurs protéiques du cancer colorectal et un immunoessai pour la détection d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes associés aux tumeurs (Ostendorff *et al.*, 2013).

3.2. PLATEFORMES EN FORMAT PLANAIRE

Des plateformes d'immunoessais en format planaire sont également disponibles. Pour les utilisateurs, ce format présente un certain avantage par rapport au format en suspension : il est plus familier puisque le support est majoritairement représenté par le format standard des plaques de microtitration 96-puits. De plus, il est plus facilement intégré à des automates de pipetage déjà installés dans les laboratoires.

Trois exemples de plateformes sont présentés ici : la technologie MULTI-ARRAY de Meso Scale Discovery (www.mesoscale.com), la technologie Q-Plex™ de Quansys Biosciences (www.quansysbio.com) et la technologie Simoa™ de Quanterix (www.quanterix.com).

3.2.1. TECHNOLOGIE MULTI-ARRAY

Cette technologie développée par Meso Scale Discovery utilise la détection par électrochimiluminescence. Le test est basé sur un immunoessai de type sandwich dont l'anticorps de détection possède un marquage chimiluminescent. Lorsqu'un champ électrique est appliqué, les électrodes en fond de puits oxydent électrochimiquement le complexe de ruthénium $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Ce complexe excité émet alors de la lumière en retournant à son état fondamental. La sensibilité de cette technologie est fortement augmentée grâce au pouvoir de régénération du ruthénium. Pour cela, la tripropylamine permet le passage du complexe à son état excité de façon cyclique en lui cédant un électron (Figure 2-6). Il y a donc amplification du signal par génération de plusieurs photons par immuno-complexe (Tighe *et al.*, 2013). Plusieurs instruments fabriqués par Meso Scale Discovery sont disponibles pour la détection du signal, notamment par caméra CCD.

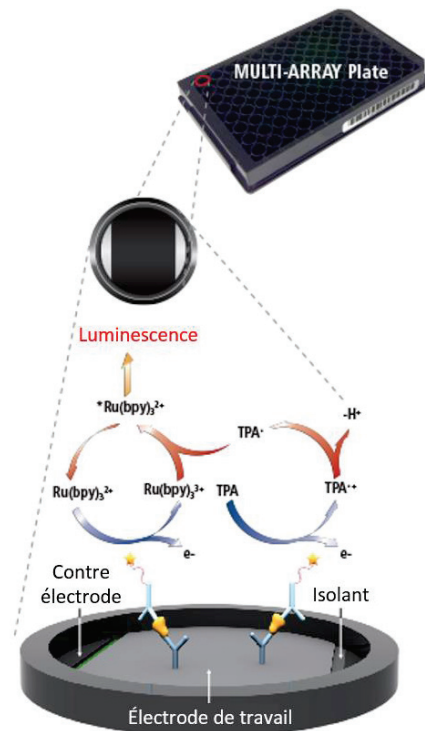


Figure 2-6. Principe de la technologie MULTI-ARRAY (adapté de www.mesoscale.com). TPA, tripropylamine

Chaque puits d'une plaque MULTI-ARRAY peut contenir jusqu'à 10 plots. La capacité de multiplexage de cette technologie est donc de 10 analytes, largement inférieure aux capacités revendiquées pour des plateformes avec des formats en suspension. Elle présente cependant d'autres avantages, notamment l'utilisation d'une stimulation électrique pour l'émission du signal lumineux ce qui permet d'éviter certains problèmes liés à l'utilisation d'une lumière d'excitation, tel que l'auto-fluorescence (Tighe *et al*, 2013).

Meso Scale Discovery propose des trousse d'analyses en multiplexe pour diverses applications comme la détection de panels de cytokines, de protéines liées à l'angiogenèse ou à la neuro-inflammation.

Une étude de Chowdhury *et al.* a comparé cette plateforme à celle de Luminex pour l'analyse de plusieurs cytokines. Concernant l'aspect pratique, la plateforme de Luminex nécessite plus d'entretien du fait de son système fluidique. Elle a cependant l'avantage de pouvoir mesurer un plus grand nombre d'analytes que la plateforme MULTI-ARRAY. Quant à la comparaison de leurs performances, celle-ci a démontré une meilleure sensibilité de la plateforme MULTI-ARRAY pour toutes les cytokines testées. Les deux plateformes ont montré une haute fidélité intra-essai (répétabilité et reproductibilité) avec un coefficient de variation inférieur à 25%. La fidélité inter-essai et la justesse étaient similaires pour les deux plateformes pour de fortes concentrations de cytokines. Cependant, la mesure de faibles concentrations d'analytes a montré des performances différentes : la plateforme issue de la

technologie Luminex est moins sensible et perd en justesse mais possède une meilleure fidélité tandis que la plateforme MULTI-ARRAY présente une plus faible fidélité mais est plus sensible avec une meilleure justesse (Chowdhury *et al*, 2009). Ainsi, cette étude comparative met en avant la nécessité pour l'utilisateur de définir les paramètres prioritaires d'une plateforme selon leur besoin et d'évaluer les performances analytiques de cette dernière.

3.2.2. TECHNOLOGIE Q-PLEX™

La plateforme Q-Plex™ se présente en format de plaque de microtitration 96-puits, comportant au fond de chaque puits une matrice de sondes (anticorps de capture). La détection de l'immunoessai de type sandwich se fait par un marquage chimiluminescent. Quansys Biosciences propose des lecteurs de plaque adaptés : la gamme Q-View™ Imager. Cette technologie peut mesurer simultanément jusqu'à 25 protéines.

Parmi les produits proposés par Quansys Biosciences, on retrouve des trousseaux pour l'analyse multiplexe de cytokines, de marqueurs de l'angiogenèse ou encore d'anticorps IgG dirigés contre des antigènes polysaccharidiques du pneumocoque. Il est également possible de créer des trousseaux d'analyse à façon.

Trune *et al*. ont comparé les performances de quatre plateformes dont celle de Quansys Biosciences. L'étude a conclu que la plateforme Q-Plex™ faisait partie des deux technologies montrant la meilleure sensibilité. Cette plateforme a également une sensibilité supérieure à celle des analyses ELISA monoparamétriques réalisées pendant l'étude (Trune *et al*, 2011).

Enfin, l'équipe de Goodison a développé un immunoessai multiplexe pour un panel de marqueurs du cancer de la vessie. Ce test, basé sur la technologie Q-Plex™, a montré des performances diagnostiques comparables à celles des tests ELISA classiques monoparamétriques avec une aire sous la courbe ROC respectivement de 0,9476 et 0,9119 (Rosser *et al*, 2014b). L'étude a ainsi mis en avant le potentiel de cette technologie pour des applications diagnostiques.

3.2.3. TECHNOLOGIE SIMOA™

Cette technologie particulière combine les microsphères que l'on retrouve habituellement dans des formats en suspension à un format planaire. Elle permet l'isolation et la détection de molécules uniques (*single-molecule arrays*, SiMoAs). Le principe de la technologie est décrit dans la Figure 2-7 (a). La première étape est similaire aux formats en suspension : il y a d'abord formation d'un immuno-complexe (immunoessai de type sandwich) sur des microsphères portant à leur surface les anticorps de capture. Ce complexe possède un marquage enzymatique. Les microsphères, ou billes, sont ensuite transférées sur un support solide contenant des puits de la taille du femtolitre. Chaque microsphère

est ainsi isolée dans un puits. Après ajout du substrat et scellage des puits, les microsphères liées à un immuno-complexe génèrent de la fluorescence. Il est ainsi possible de détecter de très faibles concentrations de fluorophores grâce au confinement de la microsphère dans un volume extrêmement faible (50 fL), assurant une forte concentration locale des molécules. Cette détection n'aurait pas été possible avec des méthodes classiques utilisant des plaques de microtitration 96-puits puisque les fluorophores diffuseraient dans un volume plus important (de 0,1 à 1 mL) (Rissin *et al*, 2010).

La plateforme Simoa™ se présente sous la forme d'un disque comprenant 24 puces (une puce par échantillon) (Figure 2-7, d). Chaque puce contient 216 000 puits. Le disque contient également des canaux microfluidiques pour le transfert des échantillons (Kan *et al*, 2012). L'analyse du disque se fait par un instrument développé par Quanterix : le Simoa HD-1 Analyzer.

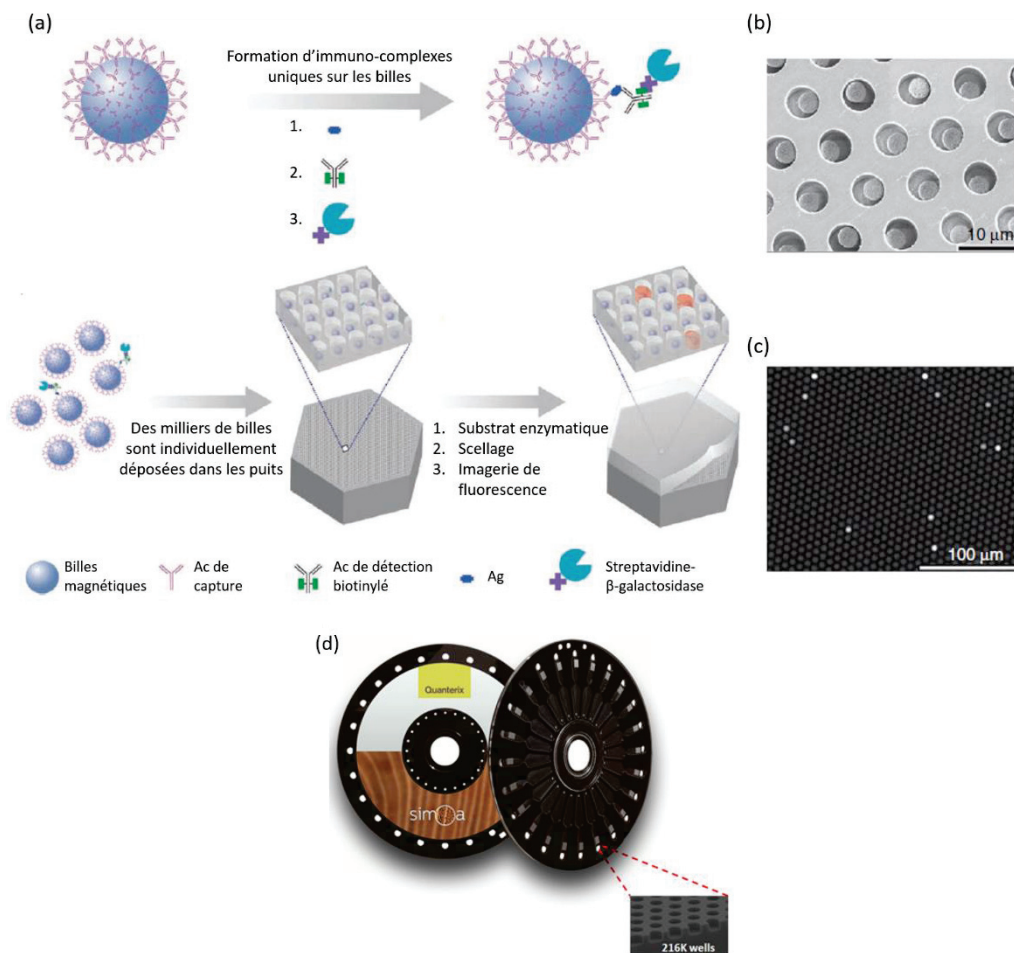


Figure 2-7. Principe de la technologie Simoa™ (adapté de Rissin *et al*, 2010) (a) Étapes du test (b) Image de microscopie électronique à balayage des puits (c) Image de fluorescence des puits (d) Simoa Disc (extrait de www.quanterix.com)

Une publication récente de Quanterix décrit le développement d'un test multiplexe sur la plateforme Simoa™ pour la quantification de six cytokines (Rivnak *et al*, 2015). L'évaluation des performances a montré des limites de détection entre 0,01 et 0,03 pg/mL et une très haute fidélité avec un coefficient de variation moyen de 4,2%. C'est donc une des plateformes les plus sensibles disponibles sur le marché.

Chapitre 3. Le cancer de la vessie

1. ÉPIDÉMIOLOGIE

Les cancers font partie des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde et étaient à l'origine de 8,2 millions de décès en 2012 (Ferlay *et al*, 2015). Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a mis en place une base de données appelée GLOBOCAN qui fournit des estimations de l'incidence, de la mortalité, de la prévalence ainsi que de l'espérance de vie corrigée de l'incapacité (EVCI) des principaux cancers, aux niveaux national et mondial. L'actuelle version de la base de données, GLOBOCAN 2012, présente les dernières estimations et données sur l'impact des cancers dans 184 pays ou territoires.

Au niveau mondial, le cancer de la vessie est la neuvième cause la plus fréquente de cancer. En termes d'incidence, il est classé septième chez l'homme avec un taux d'incidence standardisé sur l'âge de 9,0 pour 100 000 hommes (Ferlay *et al*, 2013). La représentation géographique de la Figure 3-1 montre les taux d'incidence les plus élevés pour les pays d'Europe et d'Amérique du Nord. 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. L'incidence varie également selon le sexe, avec une majorité masculine de patients atteints du cancer de la vessie (Figure 3-2). En France, le cancer de la vessie est classé quatrième chez l'homme avec une incidence estimée à 9 549 en 2012. Il est également au quatrième rang chez l'homme en termes de mortalité (Binder-Foucard *et al*, 2013).

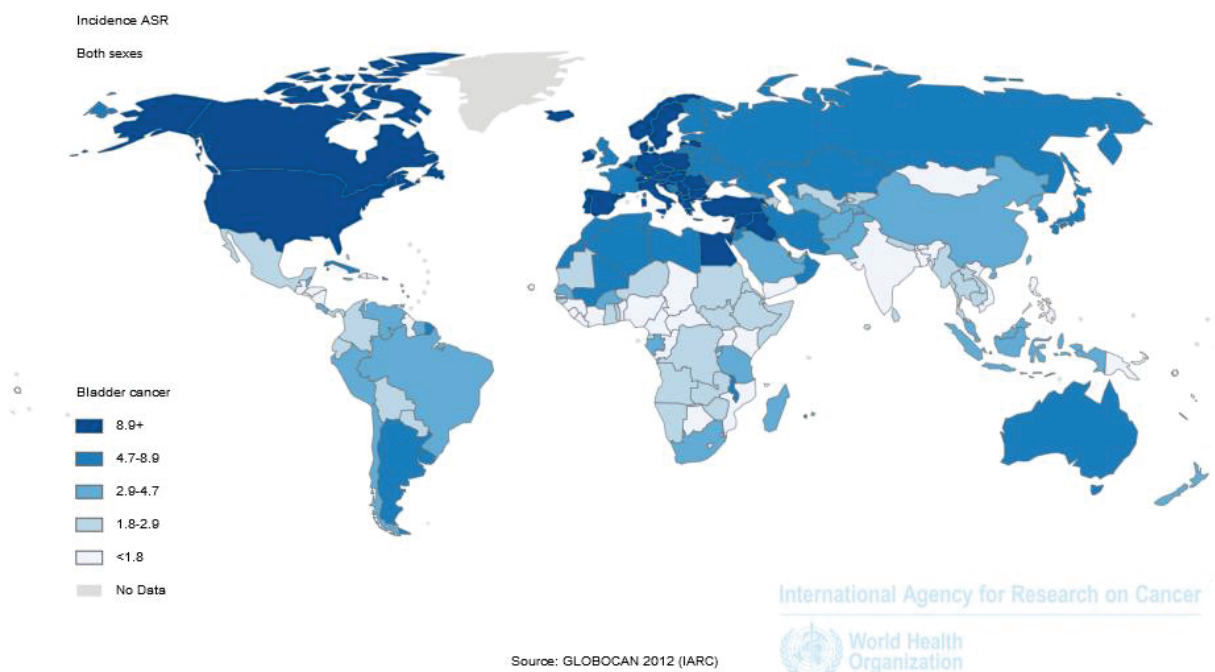


Figure 3-1. Représentation géographique du taux d'incidence du cancer de la vessie estimé et normalisé selon l'âge, pour 100 000 personnes, tout sexe et âge confondus (Ferlay *et al*, 2013)

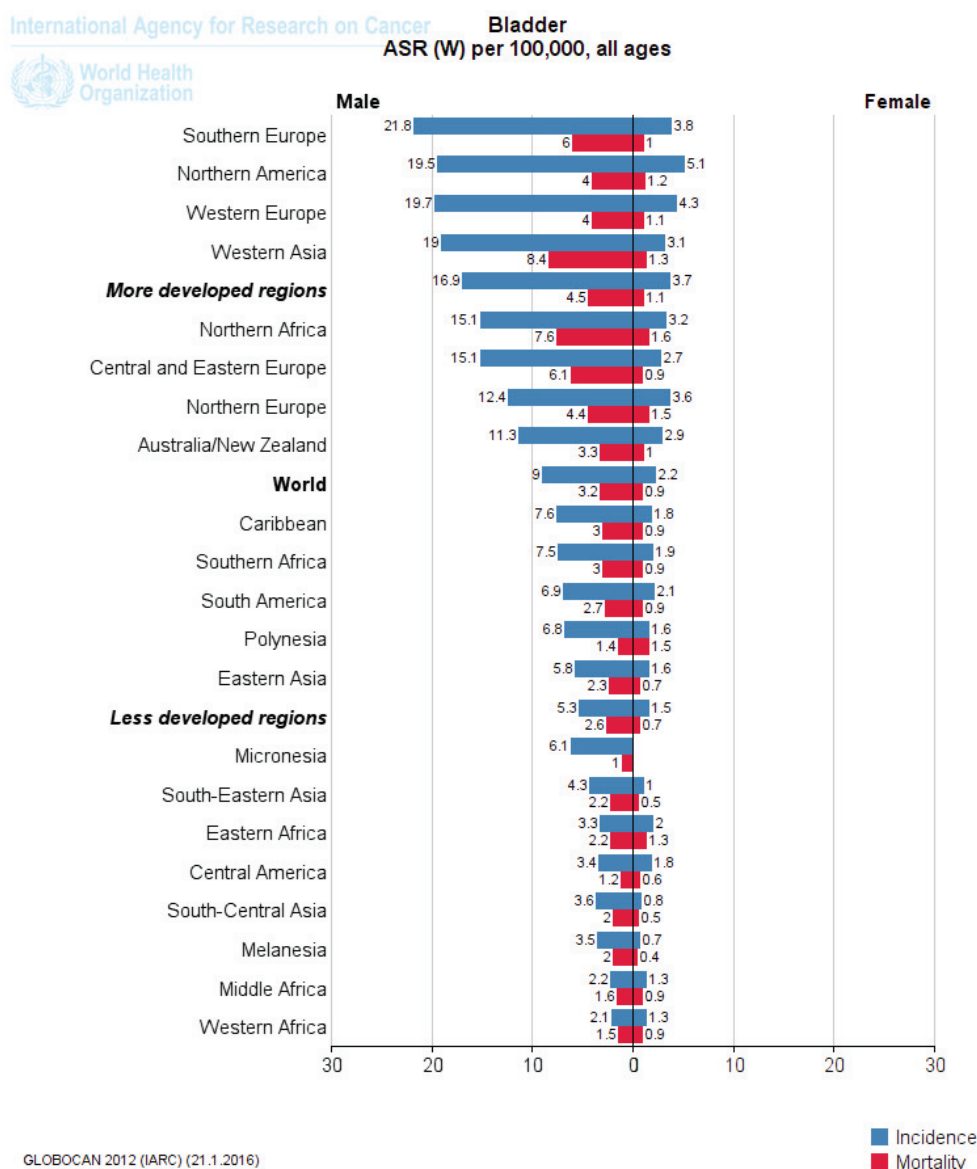


Figure 3-2. Taux d'incidence (bleu) et de mortalité (rouge) du cancer de la vessie pour 100 000 personnes, normalisés selon l'âge et classés par localisation et par sexe (Ferlay et al, 2013)

De plus, le type de cancer de la vessie diffère selon la localisation géographique, en lien avec les facteurs de risques prédominants de chaque pays. Ainsi, le tabac et certains carcinogènes chimiques d'origine professionnelle (comme les amines aromatiques) sont les principaux facteurs de risques dans les pays occidentaux et sont associés à des carcinomes à cellules transitionnelles. Un lien a également été établi entre le tabagisme et le taux d'incidence du cancer de la vessie selon le sexe. Historiquement, les pays occidentaux présentaient une prévalence plus élevée du tabagisme chez les hommes que chez les femmes. Cette prévalence a ensuite diminué chez les hommes tandis qu'une augmentation de la consommation tabagique a débuté chez les femmes à partir des années 1970 et 1980. Ainsi, on observe actuellement une diminution de l'incidence du cancer de la vessie chez les hommes et une augmentation de celle-ci chez les femmes, reflétant les changements d'habitudes tabagiques avec une

période de latence (le cancer de la vessie est diagnostiqué à l'âge moyen de 70 ans) (HAS & INCa, 2010; Burger *et al*, 2013).

Le développement d'un carcinome à cellules squameuses est lui associé à la schistosomiase (ou 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'Égypte, pays présentant un des taux les plus élevés d'incidence du cancer de la vessie avec 21,8 cas pour 100 000 hommes (Jemal *et al*, 2011; Ferlay *et al*, 2013).

Il est intéressant de noter qu'un changement de type de cancer a été observé suite à l'évolution des facteurs de risque dans certains pays. En Égypte, 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 (Felix *et al*, 2008; Ploeg *et al*, 2009). L'urbanisation, l'industrialisation et donc l'exposition aux carcinogènes chimiques génèrent une évolution similaire vers le carcinome à cellules transitionnelles dans certains pays en voie de développement. À l'inverse, le déclin du tabagisme et de l'exposition aux carcinogènes chimiques dans les pays occidentaux a permis la diminution à la fois de l'incidence et de la mortalité du cancer de la vessie (Ploeg *et al*, 2009).

2. CLASSIFICATIONS DES TUMEURS DE LA VESSIE

La vessie fait partie de l'appareil urinaire et est un réservoir temporaire de l'urine. C'est un organe creux dont la paroi est composée de trois couches :

1. La muqueuse : elle est composée d'un épithélium et d'un chorion (lamina propria). L'épithélium, appelé urothélium, tapisse l'intérieur de la vessie et est donc en contact avec l'urine. Il est composé de cellules urothéliales (ou transitionnelles).
2. La musculieuse (ou détrusor) : elle est subdivisée en trois feuillets de tissu musculaire lisse qui sont la couche interne longitudinale, la couche moyenne circulaire et la couche externe longitudinale.
3. 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 (Billerey *et al*, 2001; Deneff JF - Université Catholique de Louvain - Faculté de Médecine, 2013).

2.1. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE

Histologiquement, les tumeurs peuvent être classées en quatre catégories :

1. 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, décrits ci-dessous).
2. Les carcinomes à cellules squameuses (ou épidermoïdes) : ils représentent moins de 10% des cancers de la vessie. C'est le type histologique associé le plus à la schistosomiase.
3. Les adénocarcinomes : ils concernent 0,5% à 2% des tumeurs malignes de la vessie.
4. Les cancers à cellules indifférenciées : cette catégorie regroupe toutes les autres formes histologiques dont les cancers à petites cellules (CPC). Ces derniers sont extrêmement rares et représentent 0,5% à 1% des cancers de la vessie (Tiguert *et al*, 1999; Clark *et al*, 2013; InfoCancer, 2015c).

2.2. CLASSIFICATION CLINIQUE

Selon les *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines* (Clark *et al*, 2013; NCCN, 2015), le tableau clinique du cancer de la vessie se divise en trois catégories (Figure 3-3) qui diffèrent dans leurs pronostic, prise en charge et objectif thérapeutique :

1. Tumeurs de vessie non infiltrantes du muscle (TVNIM) ou superficielles : ce sont des tumeurs urothéliales confinées à la muqueuse.
2. Tumeur de vessie avec infiltration musculaire (TVIM) : ce sont des tumeurs envahissant le muscle vésical.
3. Lésions métastatiques

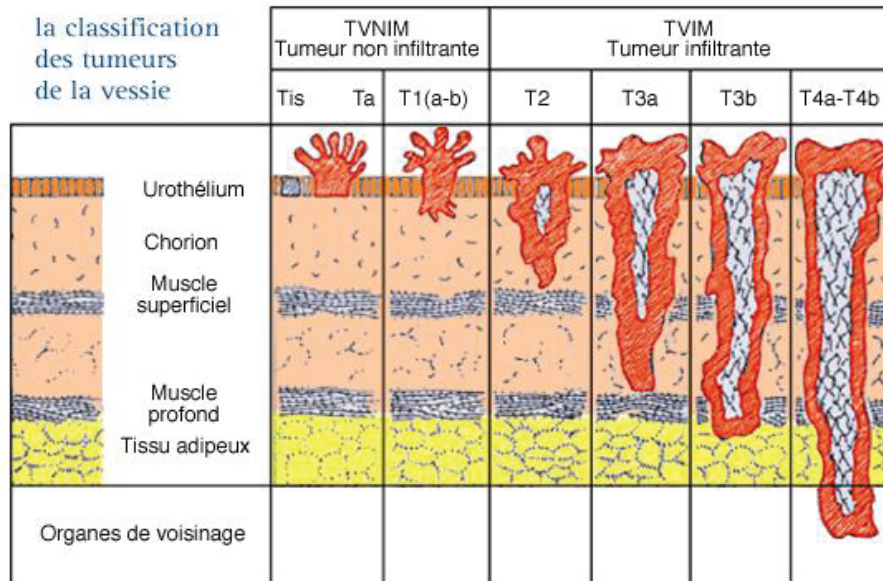


Figure 3-3. Classification des tumeurs de la vessie (InfoCancer, 2015b)

Plus précisément, 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 3-1). Cette classification ne concerne que les carcinomes urothéliaux. Il s'agit d'une stadification anatomo-pathologique à partir des prélèvements tissulaires de résection endoscopique et/ou sur pièce de cystectomie : on parle alors de pTNM (HAS & INCa, 2010; InfoCancer, 2015b). Comme le montre la Figure 3-3, le système pTNM est lié à la classification TVNIM/TVIM puisque les TVNIM regroupent les stades pTis, pTa et pT1 tandis que les TVIM regroupent les stades pT2 et supérieurs.

La fréquence et les taux de survie du cancer de la vessie 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 80% tandis que les TVIM représentent 20% à 30% des cancers avec une survie à 5 ans inférieure à 50% (HAS & INCa, 2010).

Tableau 3-1. Classification TNM 2009 des tumeurs de la vessie de l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) (Pfister et al, 2013)

T (Tumeur primitive)	
Tx	Tumeur primitive ne pouvant être classée
T0	Pas de tumeur primitive décelable
Ta	Tumeur papillaire non invasive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : « tumeur plane »
T1	Tumeur envahissant le chorion
T2	Tumeur envahissant la musculature – T2a : Tumeur envahissant le muscle superficiel (moitié interne) – T2b : Tumeur envahissant le muscle profond (moitié externe)
T3	Tumeur envahissant le tissu péri-vésical – T3a : Envahissement microscopique – T3b : Envahissement extra-vésical macroscopique (masse extra-vésicale)
T4	Envahissement d'un organe péri-vésical ou de la paroi – T4a : Prostate, utérus ou vagin – T4b : Paroi pelvienne ou paroi abdominale
N (Adénopathies régionales)	
Nx	Ganglions non évaluables
N0	Pas de métastase ganglionnaire
Atteinte des ganglions hypogastriques, obturateurs, iliaques externes ou pré-sacrés :	
N1	Un seul ganglion atteint
N2	Plusieurs ganglions atteints
Atteinte des ganglions de l'iliaque commune :	
N3	Un ou plusieurs ganglions
M (Métastases à distance)	
M0	Absence de métastase à distance
M1	Métastase(s) à distance

NB : Cette classification concerne uniquement les carcinomes urothéliaux.

2.3. GRADE CELLULAIRE

Le grade cellulaire permet une estimation de la rapidité de la croissance tumorale et donc de l'agressivité de la tumeur. Il est établi à partir d'un examen microscopique des caractéristiques cellulaires du tissu prélevé. La référence actuelle pour les tumeurs urothéliales est la classification OMS 2004 mais la classification OMS 1973 est encore largement utilisée en pratique clinique (HAS & INCa, 2010; InfoCancer, 2015b). Ces deux classifications ne sont pas strictement équivalentes. Leur comparaison (Figure 3-4) montre une majoration des carcinomes de haut grade avec la classification

OMS 2004. La classification OMS 2004 n'étant pas encore complètement validée d'un point de vue clinique, il est recommandé d'établir le grade des tumeurs en utilisant à la fois la classification OMS 1973 et OMS 2004 (Montironi & Lopez-Beltran, 2005; Clark *et al*, 2013).

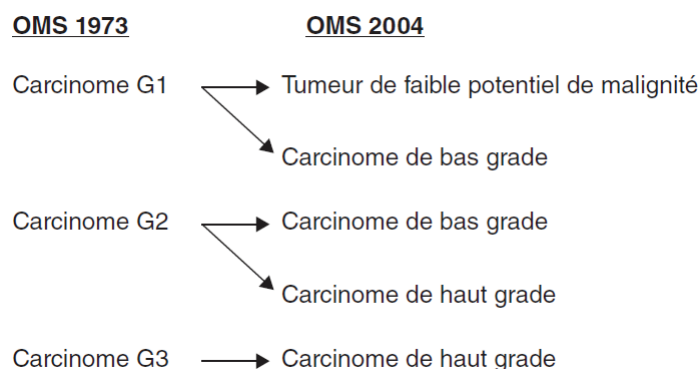


Figure 3-4. Comparaison des classifications OMS 1973 et OMS 2004 (extrait de (Pfister *et al*, 2013))

2.4. RÔLE DE LA CLASSIFICATION DES TUMEURS DANS LE PRONOSTIC DE LA RÉCIDIVE ET DE LA PROGRESSION DU CANCER DE LA VESSIE

Au cours de l'histoire naturelle du cancer de la vessie, 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, avec une infiltration du muscle dans 10% à 30% des cas (HAS & INCa, 2010; Pfister *et al*, 2013). Le risque de récurrence peut être évalué selon le stade de la tumeur (Tableau 3-2). Ainsi, ces données soulignent l'importance du suivi des patients pour permettre une détection précoce d'une récurrence ou d'une progression.

Tableau 3-2. Estimation du risque de récurrence et de progression d'une tumeur de la vessie (HAS & INCa, 2010; Pfister *et al*, 2013)

Niveau de risque	Caractéristiques tumorales
Faible	- Ta unique, bas grade ou LMP* (grades 1 et 2) et diamètre < 3 cm et non récidivée
Intermédiaire	- Ta bas grade (grade 1 et 2) ou LMP multifocal et/ou récidivante - T1 de bas grade (grade 1-2)
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)

De plus, il est possible de calculer la probabilité de récurrence et de progression chez les patients atteints de 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). Comme le montre la Figure 3-5, cette probabilité est estimée à partir de 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* (CIS) concomitant (Sylvester *et al*, 2006).

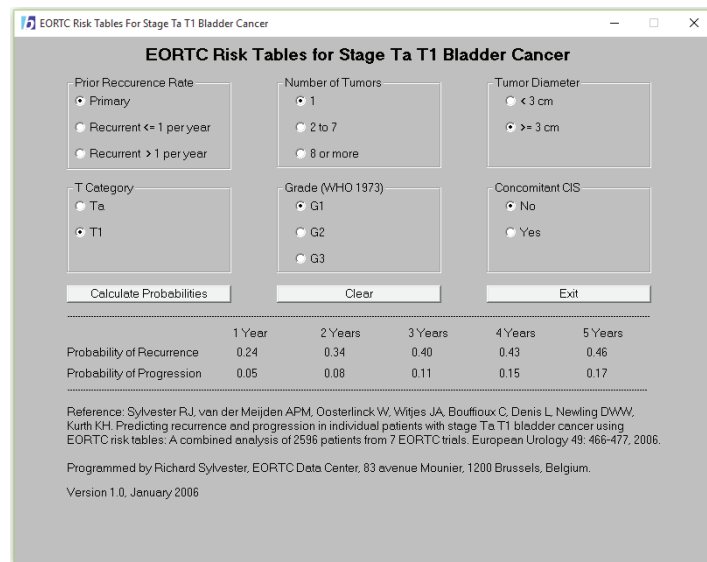


Figure 3-5. Tableaux de risques EORTC pour la prédiction de récurrence et de progression chez des patients atteints d'un cancer de la vessie de stade Ta ou T1 (EORTC, 2006)

Le grade cellulaire et le stade tumoral sont donc deux facteurs importants pour la prise en charge ultérieure des patients.

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. Suivent alors l'interrogatoire (avec la recherche des facteurs de risque) et l'examen clinique, bien que ce dernier soit le plus souvent normal pour les stades précoces (HAS & INCa, 2010; Pfister *et al*, 2013).

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 anatomo-pathologique 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 (Sharma *et al*, 2009; HAS & INCa, 2010; Pfister *et al*, 2013).

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*. À 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. De plus, cet examen nécessite un cytopathologiste qualifié et les résultats peuvent être opérateur-dépendants (Budman *et al*, 2008; Shariat *et al*, 2008; Vordos & Ploussard, 2009).

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-tomodensitométrie ou uro-TDM) ou une urographie intraveineuse.

S'il s'agit d'une TVIM, le bilan d'extension se fera alors par la TDM 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 (HAS & INCa, 2010).

4. PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE

Les options thérapeutiques diffèrent selon le tableau clinique du cancer.

4.1. TRAITEMENT DES TVNIM (TA, T1 ET CIS)

La RTUV est la première étape du traitement des tumeurs non infiltrantes. Elle a donc à la fois un intérêt diagnostique et thérapeutique. 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 (HAS & INCa, 2010; Babjuk *et al*, 2011; Pfister *et al*, 2013).

Le traitement par IPOP permet de réduire le risque de récurrence locale lié à la présence de cellules tumorales libérées lors de la RTUV. La mitomycine C est un antibiotique néoplasique isolé de *Streptomyces caespitosus*. En tant qu'agent alkylant, elle inhibe la synthèse d'ADN des cellules tumorales par alkylation (Chopin & Gattegno, 2001; Pfister *et al*, 2013).

Ensuite, la prise en charge thérapeutique est discutée en fonction du risque de récurrence et de progression tumorale (Tableau 3-3).

Tableau 3-3. Prise en charge des TVNIM après RTUV et IPOP selon le risque de récurrence et de progression (HAS & INCa, 2010; Babjuk et al, 2011)

Niveau de risque	Traitement
Faible	Surveillance simple
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.
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 et Guérin ; IPOP, instillation postopératoire précoce ; RTUV, résection transurétrale de la vessie

Le BCG (Bacille de Calmette et Guérin), une souche atténuée du bacille *Mycobacterium bovis*, a d’abord été développé pour la vaccination contre la tuberculose au début du 20^{ème} siècle. Les premiers travaux décrivant l’utilisation du BCG par voie endovésicale chez des patients atteints du cancer de la vessie datent de 1976 (Morales *et al*, 1976). Le mécanisme d’action exact du BCG dans le traitement du cancer de la vessie n’est pas entièrement connu. Il a cependant été démontré que le BCG est internalisé par les cellules urothéliales et les cellules cancéreuses de la vessie. Cela induit une réaction immunitaire impliquant la libération de plusieurs cytokines ainsi que des cellules immunitaires dont les cellules dendritiques et les macrophages. L’activité antitumorale alors induite engage à la fois le système immunitaire acquis et le système immunitaire inné. L’efficacité de l’immunothérapie par le BCG vis-à-vis de la prévention des récurrences et de la progression du cancer de la vessie a été prouvée par diverses études (Fialho & Chakrabarty, 2010; Fuge *et al*, 2015).

4.2. 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 possibles 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) (HAS & INCa, 2010; Pfister *et al*, 2013).

4.3. 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 (HAS & INCa, 2010; InfoCancer, 2015a).

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 (HAS & INCa, 2010).

5. SURVEILLANCE

Il existe plusieurs recommandations quant à la fréquence et les types d'examen de suivi des récidives. 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. La surveillance des TVNIM et des TVIM est décrite plus précisément dans le Tableau 3-4 et le Tableau 3-5.

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% (Van Der Aa *et al*, 2008; Van Tilborg *et al*, 2009).

Tableau 3-4. Surveillance des TVNIM selon le risque de récurrence et de progression, d'après les recommandations de la HAS et de l'INCa (HAS & INCa, 2010)

Niveau de risque	Examens
Faible	- Cystoscopie : à 3, 6, 12 mois puis annuelle pendant 5 ans (à vie si persistance de l'intoxication tabagique)
Intermédiaire	- Cystoscopie : à 3, 6, 12 mois puis annuelle pendant 15 ans (à vie si persistance de l'intoxication tabagique) - Cytologie urinaire : recommandée couplée à la cystoscopie - Uro-TDM : tous les 2 ans et en cas de cytologie positive ou de symptômes en faveur d'une atteinte du haut appareil
Élevé	- Cystoscopie : à 3, 6, 9, 12 mois puis tous les 6 mois la 2 ^{ème} année puis annuelle à vie - Cytologie urinaire : obligatoire couplée à la cystoscopie - Uro-TDM : tous les 2 ans ou si cytologie positive ou symptômes en faveur d'une atteinte du haut appareil

Tableau 3-5. Surveillance des TVIM, d'après les recommandations de la HAS et de l'INCa (HAS & INCa, 2010)

Examens	Fréquence
Examen clinique	À 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 annuellement
TDM thoraco-abdomino-pelvienne	Permet la recherche d'une récurrence locale ou métastatique À 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

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 US\$ et 202 203 US\$ par patient et risque d'augmenter avec l'amélioration des taux de survie. 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 (Sievert *et al*, 2009; Yeung *et al*, 2014).

Outre l'impact économique, le cancer de la vessie et sa prise en charge ont également un impact sur la qualité de vie des patients, lié notamment à l'altération des fonctions génito-urinaires et le suivi pour la détection de récurrence (Heyes *et al*, 2015; Nikapota *et al*, 2015). 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. 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. Bien qu'il existe déjà des outils pour l'estimation du risque de récurrence et de progression, comme les tableaux de l'EORTC, ceux-ci prennent uniquement en compte des paramètres cliniques (Black, 2016; Busato Júnior *et al*, 2016). Selon les conclusions d'une revue de la littérature concernant les outils de prédiction et de pronostic du cancer de la vessie, les biomarqueurs pourraient améliorer les performances de ces outils (Kluth *et al*, 2015)

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 à son stade, il n'existe actuellement pas de moyens de déterminer la probabilité ni la durée de réponse à un traitement médicamenteux. C'est le cas de l'immunothérapie par le BCG qui, bien qu'elle soit le traitement de choix des TVNIM à haut risque après RTUV et IPOP, n'a pas montré son efficacité chez tous les patients. En effet, 30% à 50% des patients ne sont pas répondeurs au traitement et 15% présentent une progression de la tumeur avec invasion du muscle. Plusieurs études ont montré le potentiel de certains marqueurs pour la prédiction de la réponse au traitement par le BCG mais des études plus poussées seront nécessaires pour valider leur utilité (Lima *et al*, 2012; Zuiverloon *et al*, 2012; Mertens *et al*, 2013; Kamat *et al*, 2016). Ainsi, l'utilisation de biomarqueurs prédictifs permettrait d'identifier les patients les plus susceptibles de répondre de façon favorable à une thérapie donnée.

Chapitre 4. Les biomarqueurs

1. INTRODUCTION

Selon les *National Institutes of Health*, un biomarqueur (ou marqueur biologique) est défini comme « une caractéristique biologique mesurée objectivement et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » (Biomarkers Definitions Working Group., 2001) Un biomarqueur peut donc être moléculaire, anatomique, physiologique ou biochimique.

Plus précisément, un marqueur tumoral est défini comme « une molécule, un processus ou une substance altérée quantitativement ou qualitativement dans des conditions précancéreuses ou cancéreuses, la modification étant détectable par une analyse » (Schrohl *et al*, 2003). Ces altérations peuvent provenir de la tumeur elle-même ou du tissu normal environnant.

Les biomarqueurs sont utilisés dans deux principaux domaines. En recherche biomédicale, les biomarqueurs peuvent être utilisés lors du développement et de l'évaluation de nouvelles thérapies. Ils permettent notamment d'identifier les cibles thérapeutiques, d'aider à la sélection de candidats-médicaments et contribuent à la compréhension de la pharmacologie des candidats. De plus, ils peuvent se substituer à un critère clinique lors de l'évaluation clinique d'un médicament, on parle alors de biomarqueurs de substitution (*surrogate end points*) (Biomarkers Definitions Working Group., 2001; Park *et al*, 2004; Kelloff & Sigman, 2012).

En pratique clinique, les diverses fonctions des biomarqueurs permettent d'établir une classification :

- Biomarqueurs de diagnostic : ils permettent l'identification des patients présentant une pathologie ou une condition anormale.
- Biomarqueurs de risque ou de susceptibilité : ils permettent d'estimer le risque de développer une pathologie.
- Biomarqueurs pronostiques : ils permettent de déterminer l'évolution de la pathologie. En cancérologie, les biomarqueurs pronostiques donnent une estimation du risque de récurrence.
- Biomarqueurs prédictifs : ils permettent de prédire la réponse à un traitement et donc de déterminer le traitement le plus adapté pour un patient (stratégie définie comme « médecine personnalisée »).
- Biomarqueurs de surveillance : ils sont utilisés pendant le suivi du patient. En cancérologie, ils permettent la détection de récurrence ou de rémission (Biomarkers Definitions Working Group., 2001; Schrohl *et al*, 2003; European Commission Health Research Directorate, 2012).

2. PROCESSUS DE DÉCOUVERTE ET D'IDENTIFICATION DES BIOMARQUEURS

Le développement de la médecine personnalisée a créé une forte demande de biomarqueurs pouvant être utilisés dans le cadre du diagnostic, du suivi et de la stratification des patients. En parallèle, la quête de nouveaux biomarqueurs a été relancée par l'émergence de nouvelles technologies à haut-débit ainsi que le développement d'approches systémiques pour étudier la physiopathologie de maladies comme le cancer (Ramachandran *et al*, 2008).

Le processus de découverte et d'identification décrit dans cette section concerne principalement les biomarqueurs protéiques et donc la protéomique. Le terme « protéome », apparu pour la première fois dans la littérature scientifique en 1996, 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) ou mener à la découverte de nouveaux marqueurs biologiques d'états pathologiques (Kahn, 1995; Wilkins *et al*, 1996; Ahram & Petricoin, 2008).

2.1. LES DIFFÉRENTES APPROCHES POUR LA DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS

Il existe trois approches principales pour la découverte de nouveaux marqueurs biologiques (Yu *et al*, 2010; McDermott *et al*, 2013) :

- 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. Cette approche est non biaisée car aucune supposition n'est faite sur les protéines qui pourraient être impliquées.
- L'approche fondée 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 fondée 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 (Ideker *et al*, 2001). 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 (Van Regenmortel, 2004) 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) (Yu *et al*, 2010).

Il existe deux principaux défis liés à la protéomique et l'étude de l'ensemble des protéines d'une cellule (cancéreuse par exemple). Il s'agit du besoin de nouvelles technologies pour pouvoir analyser simultanément de nombreux échantillons et protéines ainsi que le développement d'outils de bioinformatique pour gérer et analyser les grandes quantités de données obtenues (Ahram & Petricoin, 2008).

2.2. 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 (Ahram & Petricoin, 2008).

2.3. TECHNOLOGIES DE PROTÉOMIQUE

L'analyse d'échantillons cliniques pour la recherche de marqueurs biologiques se fait principalement à l'aide de deux techniques : la spectrométrie de masse et les puces à protéines. 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 spectrométrie de masse, la méthode d'ionisation SELDI (*surface-enhanced laser desorption ionization*) est apparue comme une stratégie adéquate pour découvrir les signatures ioniques de potentiels biomarqueurs, même si leur identité est inconnue (Ahram & Petricoin, 2008; Liotta & Petricoin, 2008).

L'institut américain du cancer, *National Cancer Institute* (NCI), a créé un programme intitulé *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium* (CPTAC) dont l'objectif principal est l'amélioration de la compréhension des bases moléculaires du cancer grâce aux technologies de protéomique. Ce consortium procède donc à l'analyse d'échantillons biologiques tumoraux par spectrométrie de masse, permettant ainsi l'identification et la quantification de protéines et la caractérisation du protéome de l'échantillon. L'intégration de ces données avec les données de transcriptomique et de génomique de

ces mêmes échantillons permet une meilleure compréhension des mécanismes tumoraux mais également la découverte de biomarqueurs candidats (Ellis *et al*, 2013; Edwards *et al*, 2015).

Tout comme la spectrométrie de masse, 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. Divers types de technologies sont utilisés pour la découverte de biomarqueurs (Ramachandran *et al*, 2008). Les formats de puce en phase inverse s'avèrent prometteurs pour la découverte de biomarqueurs car ils sont particulièrement adaptés à ce type d'application du fait de leurs hautes sensibilité et reproductibilité ainsi que de leur aspect quantitatif. Ces puces présentent également l'avantage de pouvoir étudier de nombreux échantillons à la fois (Akbari *et al*, 2014; Nishizuka & Mills, 2015). Les puces à protéines et leurs applications sont décrites de façon plus approfondie dans un chapitre dédié à ces outils (Chapitre 1).

Un exemple d'outil dérivé à la fois de la spectrométrie de masse et des puces à protéines est le système SELDI ProteinChip® de Bio-Rad (www.bio-rad.com). La technologie ProteinChip® 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 à un format de puce (Figure 4-1). Cette technique de spectrométrie de masse a été décrite dans le Chapitre 1, comme méthode de détection sans marquage des puces à protéines.

Le principe de la technologie ProteinChip® repose sur le dépôt d'échantillons biologiques 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 (Reddy & Dalmaso, 2003).

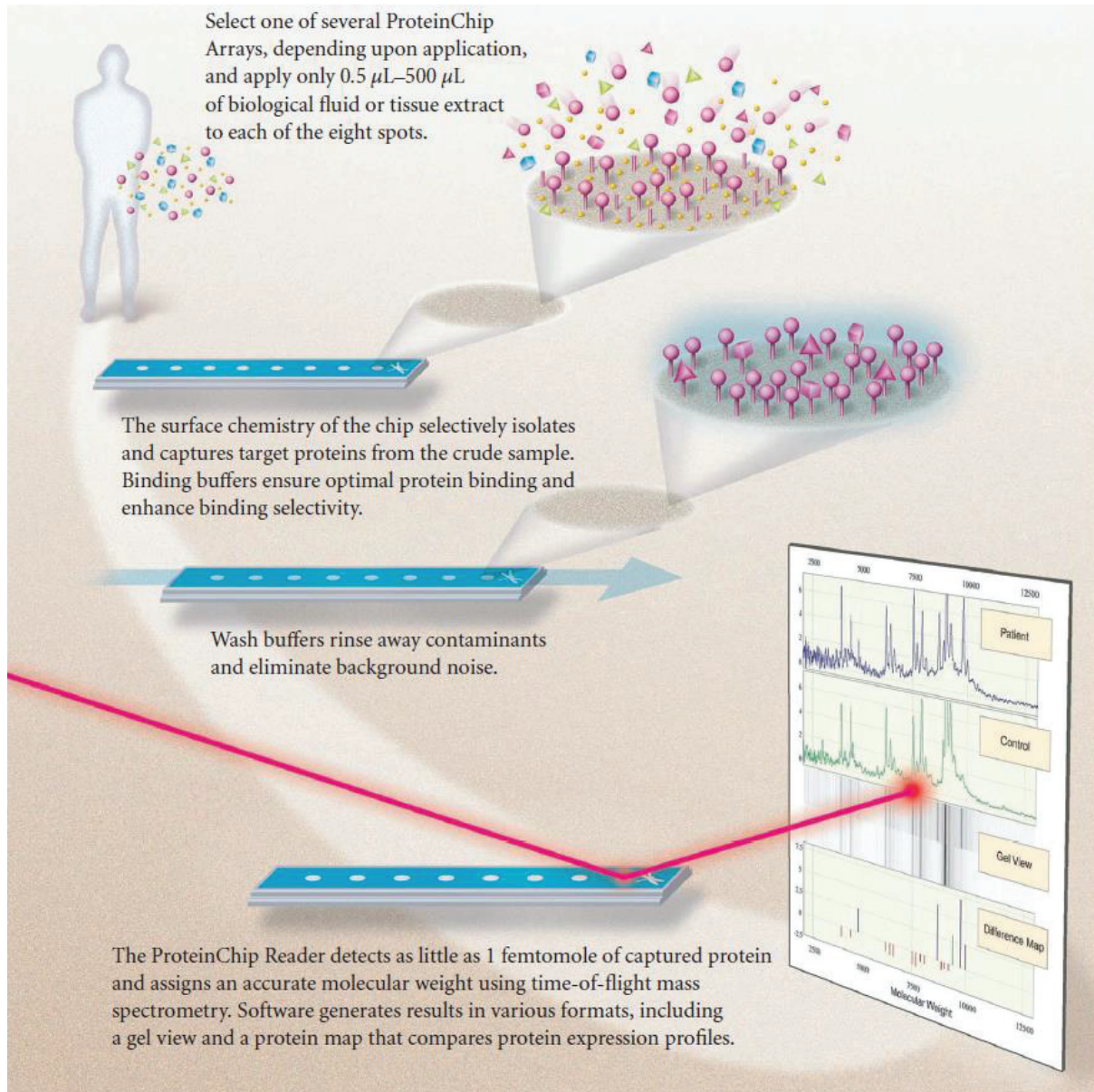


Figure 4-1. Procédure d'analyse de profils de protéines dans des échantillons biologiques par la technologie ProteinChip® (extrait de Reddy & Dalmasso, 2003)

De plus, une étude a montré le potentiel de la technologie ProteinChip® en tant qu'outil de diagnostic des tumeurs de la vessie à cellules transitionnelles. Les auteurs ont conclu que la détection par cette technologie des changements au niveau protéique 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 afin d'établir son utilité (Vlahou *et al*, 2001).

Une autre étude menée par Mueller *et al*. a utilisé la technologie ProteinChip® pour analyser des échantillons urinaires de patients atteints du cancer de la vessie. Plusieurs biomarqueurs ont pu être identifiés démontrant des performances diagnostiques de 80% en sensibilité et de 90% à 97% en

spécificité. Leur pouvoir discriminant a également été démontré pour différencier les stades invasifs de la tumeur (pT2 et pT3) des stades non-invasifs (pT1 et pTa) (Mueller *et al*, 2005).

Hormis la spectrométrie de masse et les puces à protéines, d'autres technologies émergentes sont utilisées pour la découverte de nouveaux biomarqueurs. Les différentes stratégies possibles sont résumées dans la Figure 4-2. Certaines d'entre elles reposent 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) (Kulasingam & Diamandis, 2008).

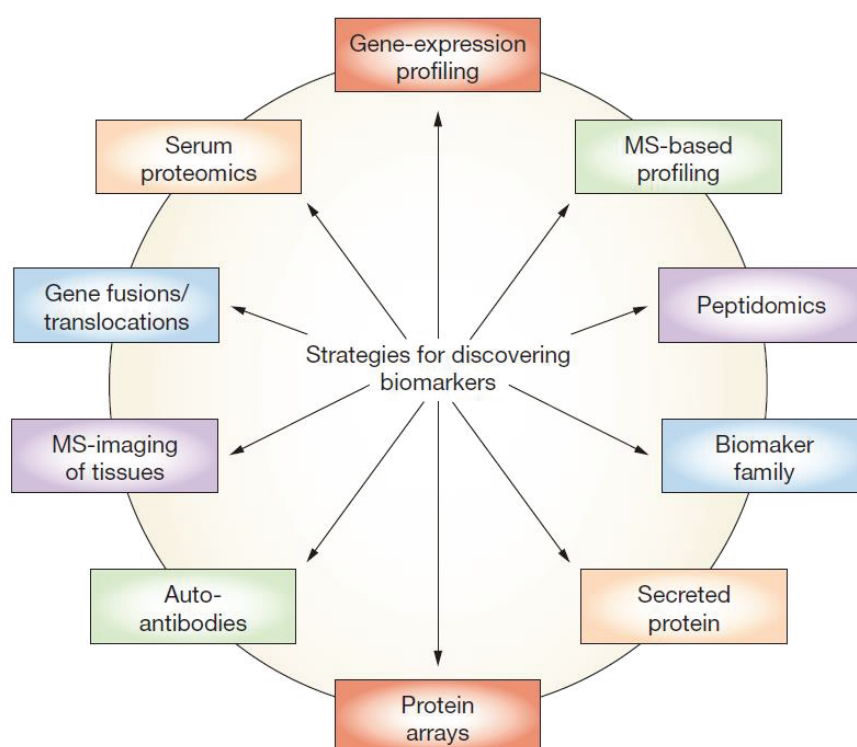


Figure 4-2. Stratégies pour la découverte de biomarqueurs. MS, spectrométrie de masse (extrait de Kulasingam & Diamandis, 2008)

3. VALIDATION DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS ET TRANSPOSITION À LA CLINIQUE

Malgré l'essor de biomarqueurs candidats identifiés grâce aux technologies de protéomique, l'impact clinique est très faible. En effet, la majorité de ces biomarqueurs n'est pas transposée à la pratique clinique comme outil d'aide à la décision. En 2011, il a été estimé que plus de 150 000 publications décrivaient le potentiel de milliers de biomarqueurs mais que seulement une centaine de biomarqueurs était utilisée en pratique clinique (Poste, 2011).

Cet état de fait est dû aux divers obstacles qui existent entre la découverte d'un biomarqueur et son introduction dans la pratique clinique : il est nécessaire de procéder à la vérification du biomarqueur puis à sa validation ainsi que celle de sa méthode d'analyse (Figure 4-3). La conception et la qualité des études cliniques, notamment le nombre d'échantillons à évaluer, sont donc des notions indispensables pour permettre à un biomarqueur de franchir toutes ces étapes (Schrohl *et al*, 2003; Frangogiannis, 2012; Frantzi *et al*, 2014).

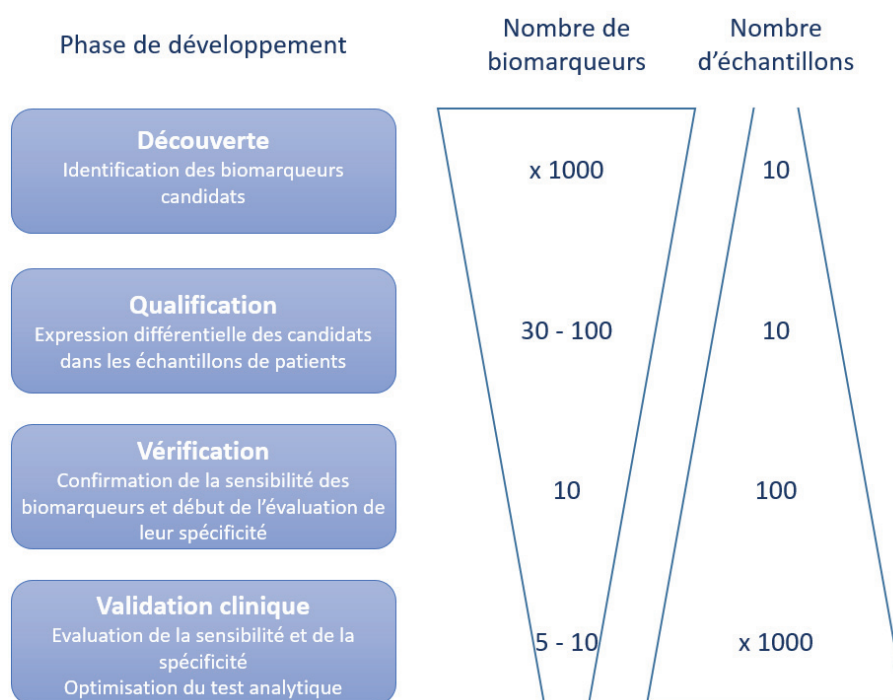


Figure 4-3. Étapes de développement d'un biomarqueur (adapté de Rifai *et al*, 2006; Frangogiannis, 2012). Le nombre d'échantillons correspond au nombre d'échantillons nécessaire pour la validation de la phase.

3.1. VALIDATION CLINIQUE

Le développement de lignes directrices a permis d'apporter une certaine standardisation des études de validation des biomarqueurs. Ainsi, 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 et déterminer les marqueurs pouvant être recommandés en pratique clinique. Il repose sur deux principes qui sont le concept d'utilité et le degré d'évidence (niveau de preuve). L'évaluation de l'utilité clinique se base sur un score semi-quantitatif selon les preuves qui corrént le marqueur avec le processus biologique et le critère évalué. Quant au niveau de preuve, il est défini par le type d'étude clinique mis en œuvre pour évaluer l'utilité clinique. Il reflète donc la qualité des données obtenues à la suite de l'étude (Hayes *et al*, 1996).

Plusieurs types d'études cliniques permettant d'évaluer l'utilité clinique d'un marqueur ont été décrits (Sargent *et al*, 2005; Freidlin *et al*, 2010). Idéalement, elle devrait être déterminée dans un essai

clinique randomisé et prospectif. Toutefois, ceci n'est pas toujours réalisable, notamment pour les marqueurs tumoraux. En effet, 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, ce qui est 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 peut être d'une grande importance pour établir l'utilité pronostique ou prédictive d'un biomarqueur (Simon *et al*, 2009; Febbo *et al*, 2011). Dans certains cas, une analyse robuste des échantillons archivés permet 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 (Amado *et al*, 2008; Karapetis *et al*, 2008).

Plus récemment, les lignes directrices *Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies* (REMARK) ont été proposées par un groupe de travail du NCI-EORTC (McShane *et al*, 2005). Elles présentent les éléments nécessaires à un rapport d'étude de biomarqueurs, notamment sur la conception de l'étude, les méthodes statistiques utilisées et la présentation des résultats. Bien qu'elles s'appliquent spécifiquement aux études de marqueurs pronostics, elles sont adaptables à d'autres types de biomarqueurs pour permettre une transparence de la validation des biomarqueurs (Ghosh & Poisson, 2009).

3.2. VALIDATION RÉGLEMENTAIRE

La validation clinique d'un biomarqueur permet de prouver son utilité en pratique clinique mais n'est pas suffisante pour qu'un test d'analyse du biomarqueur soit mis sur le marché. En effet, ce type de tests, considérés comme des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, nécessite une conformité aux réglementations propres à chaque pays.

En France, la réglementation européenne s'applique. Elle s'appuie sur le principe de la « Nouvelle Approche », concept mis en œuvre en 1985 par les états membres de la Communauté Économique Européenne (CEE) pour harmoniser les législations des États membres et permettre la libre circulation des produits au sein du marché intérieur de l'Union Européenne (UE). Les directives issues de cette « Nouvelle Approche » définissent des exigences essentielles en termes de sécurité, d'environnement et protection du consommateur tandis que les spécifications techniques du produit sont détaillées dans les normes harmonisées européennes.

Plus précisément, les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* relèvent de la directive 98/79/CE mise en place en 1998. Le fabricant doit obligatoirement apposer le marquage CE sur son produit avant sa mise sur le marché. Ce marquage indique la conformité du produit avec la législation de l'UE. De façon générale, il y a six étapes nécessaires pour apposer le marquage CE sur un produit. Celles-ci sont décrites dans la Figure 4-4.

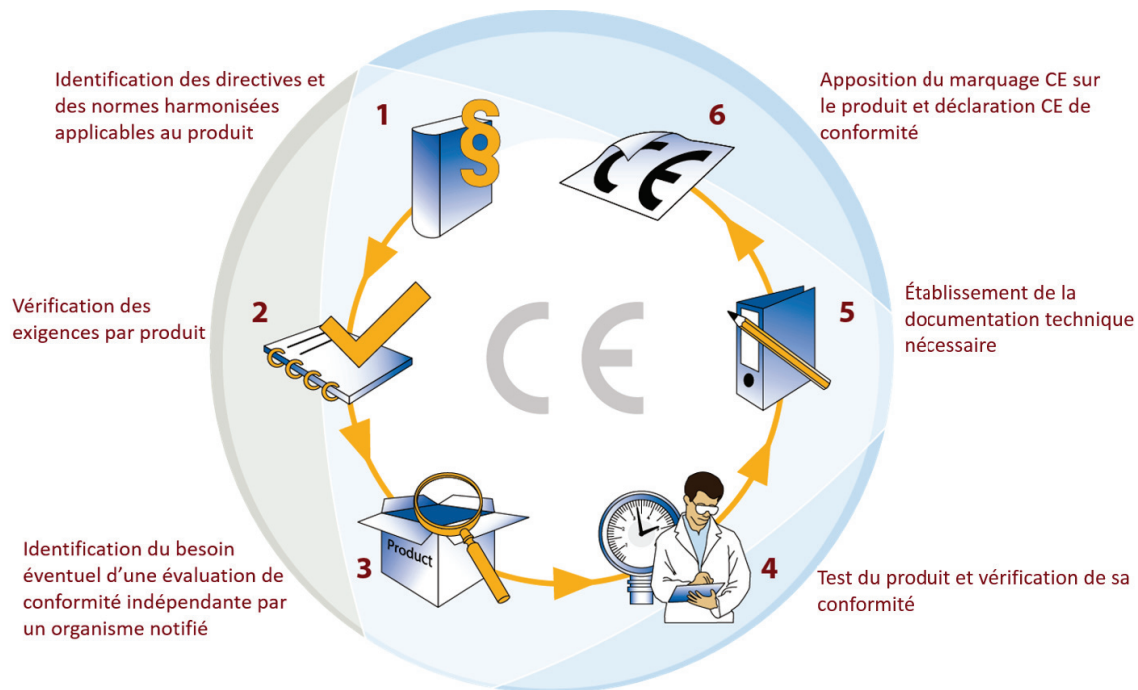


Figure 4-4. Étapes du marquage CE (extrait et adapté du site www.entreprises.gouv.fr)

Concernant les dispositifs médicaux, des projets de règlements ont été publiés le 26 septembre 2012. Ces nouveaux règlements, qui introduisent de nombreuses nouveautés, visent à remplacer les directives existantes et à garantir un niveau élevé de protection de la santé humaine et de la sécurité des personnes, notamment en exigeant d'avantage de données cliniques. Ce changement de réglementation est imminent car il est possible que les règlements soient adoptés d'ici juin 2016 (Durand-Viel, 2016).

Aux États-Unis, la mise sur le marché de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* est régulée par la *Food and Drug Administration* (FDA) depuis l'introduction des « Medical Device Amendments » en 1976. Il existe deux procédures différentes selon la classe du dispositif et donc selon le risque lié à son utilisation. La procédure dite « 510(k) » est utilisée lorsque le dispositif peut être comparé à un dispositif déjà sur le marché et repose sur une déclaration d'équivalence sur la base de données comparant les performances des deux dispositifs. Pour les dispositifs sans produit comparable sur le marché et ceux de plus haut risque, la procédure « PMA » (*pre-market approval*) s'applique. Cette procédure nécessite, en plus des mêmes données demandées dans la procédure « 510(k) », des résultats cliniques prouvant le lien entre le marqueur et la pathologie (Rifai *et al*, 2006).

4. LES BIOMARQUEURS URINAIRES DU CANCER DE LA VESSIE

L'urine présente plusieurs avantages dans la détection de biomarqueurs. Son prélèvement est simple et non invasif. De plus, l'urine est une source très diversifiée de biomarqueurs candidats, permettant la détection et le suivi de nombreux processus physiologiques et pathologiques différents. En effet, les protéines présentes dans l'urine peuvent refléter un dysfonctionnement des cellules de l'appareil urinaire (par exemple, par excrétion des cellules épithéliales) mais également d'autres dysfonctionnements par le passage de protéines du sang vers l'urine lors de la filtration glomérulaire (Barratt & Topham, 2007; Thomas *et al*, 2010).

Ainsi, 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.

4.1. BTA-TRAK™ ET BTA-STAT™

BTA-TRAK™ et BTA-stat™ (Polymedco, www.polymedco.com) 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 (Kinders *et al*, 1998; Campos-Fernandes *et al*, 2007).

Le test BTA-TRAK™ correspond à un dosage quantitatif par une méthode immuno-enzymatique de type sandwich, utilisant deux anticorps monoclonaux (Cheng *et al*, 2005) 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 inférieure due à la possibilité de faux-positifs notamment lors de pathologies génito-urinaires non tumorales (Campos-Fernandes *et al*, 2007; Budman *et al*, 2008). Ces tests ont été approuvés par la FDA uniquement pour le suivi 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 (Shariat *et al*, 2008).

4.2. NMP22

NMP22 (*nuclear matrix protein 22*) est un élément de la structure du noyau et un important régulateur de la mitose. Dans un contexte tumoral, NMP22 est présente à une concentration plus élevée dans les cellules cancéreuses (celles-ci présentant des altérations de la structure du noyau) et est libérée dans l'urine lors de l'apoptose des cellules.

Il existe deux tests commercialisés par Alere (www.alere.com) : 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 (Shariat *et al*, 2008).

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 (Campos-Fernandes *et al*, 2007; Shariat *et al*, 2008; Van Tilborg *et al*, 2009).

4.3. IMMUNOCYT™

ImmunoCyt™ est un test commercialisé par Scimedx (www.scimedx.com). 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 de verre 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. Ce test est approuvé par la FDA pour la surveillance du cancer de la vessie, en conjonction avec la cytologie urinaire et la cystoscopie.

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 (Campos-Fernandes *et al*, 2007; Budman *et al*, 2008; Vrooman & Witjes, 2008).

4.4. BLCA-4

Une protéine de la matrice nucléaire (NMP) spécifique du 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 (Konety *et al*, 2000).

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 % (Konety *et al*, 2000; Van Le *et al*,

2005). 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.

4.5. CYTOKÉRATINES

Les cytokératines constituent les protéines des filaments intermédiaires spécifiques aux cellules épithéliales. Vingt isotypes 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 (Campos-Fernandes *et al*, 2007; Van Tilborg *et al*, 2009). Le test développé par Roche est basé sur la technologie Elecsys® (www.cobas.com). L'immunoessai de type sandwich comprend un anticorps monoclonal biotinylé ainsi qu'un anticorps monoclonal conjugué à un complexe de ruthénium $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, formant un immuno-complexe avec l'analyte présent dans l'échantillon. L'ajout de microsphères fonctionnalisées par la streptavidine permet la liaison du complexe immunitaire à la phase solide. Le mélange réactionnel est ensuite transféré dans la cellule de mesure et les microsphères sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. Enfin, une différence de potentiel est appliquée à l'électrode, permettant l'émission de chimiluminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur (Sánchez-Carbayo *et al*, 1999).

Dans le cadre du cancer de la vessie, les performances de ce test varient de 43% à 79% 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 récurrences. 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 (Fernandez-Gomez *et al*, 2007).

D'autres fragments de cytokératines ont été évalués pour leur utilité dans le cancer de la vessie. IDL Biotech (www.idlbiotech.com) a ainsi développé plusieurs tests pour le dosage de fragments solubles des cytokératines 8 et 18. Leur test UBC® (*Urinary Bladder Cancer*) est disponible sous deux formats quantitatifs : UBC® ELISA qui est un immunoessai de type sandwich et UBC® IRMA (*immunoradiometric assay*) basé sur un dosage immunoradiométrique. De plus, IDL Biotech propose un dosage immunochromatographique des fragments sous un format POC (test biologique délocalisé, *point-of-care*) : UBC® *Rapid*. Ce test rapide peut être utilisé pour un dosage qualitatif ou quantitatif.

Une étude a comparé les performances diagnostiques d'UBC[®] ELISA à un test NMP22 chez 240 patients présentant des symptômes de carcinome urothélial ou étant suivis suite à une RTUV. Cette étude a démontré la supériorité d'UBC[®] ELISA par rapport au test NMP22 en termes de sensibilité (64,8% et 55,5% respectivement) et de spécificité (92% et 79% respectivement). Une étude similaire a comparé UBC[®] *Rapid* à BTA-stat[™] chez le même type de patients (d'une cohorte de 180 patients), prouvant également la supériorité d'UBC[®] *Rapid* par rapport à BTA-stat[™] en termes de sensibilité (66% et 52,8% respectivement) et de spécificité (90% et 70% respectivement) (Mian *et al*, 2000a, 2000b).

Cependant, plusieurs autres études ont été menées sur les tests UCB[®], montrant des performances variables selon l'étude dont une sensibilité allant de 35% à 79% (pour la détection d'un cancer primaire et d'une récurrence). Dans certaines études de comparaison de marqueurs du cancer de la vessie, les tests UCB[®] avaient une sensibilité inférieure aux autres marqueurs, tel que BTA, et à la cytologie urinaire (Babjuk *et al*, 2002; Lokeshwar *et al*, 2005b). Quoi qu'il en soit, les performances de ces tests ne permettent pas le remplacement de la cystoscopie dans le diagnostic ou le suivi de patients atteints du cancer de la vessie.

4.6. 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. Il est dégradé en fragments par l'enzyme hyaluronidase (HAase). L'HA et son enzyme 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 dite d'*ELISA-like*. En effet, les deux tests sont similaires à un ELISA, utilisant une protéine liant l'HA (biotinylée) à la place d'un anticorps de détection. Le dosage d'HA est un test compétitif entre l'HA présent dans l'échantillon et celui fixé sur le support solide. Quant au dosage de l'HAase, l'enzyme présente dans l'échantillon dégrade l'HA fixé sur le support solide et l'HA restant après incubation sera détectée par la protéine liant l'HA (Droller, 2004; Campos-Fernandes *et al*, 2007; Van Tilborg *et al*, 2009).

Le test de l'HA seul a une sensibilité de 83,1% et une spécificité de 90,1% et celui de l'HAase 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 améliorerait les résultats quel que soit le grade de la tumeur : la sensibilité des tests combinés est de 91,2% et la spécificité est de 84,4% (Lokeshwar *et al*, 2000; Parker & Spiess, 2011). De plus, il a été conclu dans une étude comparative que le test HA-HAase présentait de meilleures performances pour la détection de la récurrence du cancer de la vessie par rapport à la cytologie et aux tests UBC[®] *Rapid* et BTA-stat[™] (Schroeder *et al*, 2004).

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 (Lokeshwar *et al*, 2005a).

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

4.7. SURVIVINE

La survivine fait partie de la famille des protéines régulant la mort cellulaire, les IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*). Elle inhibe les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose en empêchant l'activation de certaines caspases. Elle est exprimée lors du développement foetal mais n'est pas retrouvée dans les tissus adultes normaux (Campos-Fernandes *et al*, 2007; Vrooman & Witjes, 2008; Van Tilborg *et al*, 2009). 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 (Shariat *et al*, 2007).

Le dosage quantitatif de l'expression de la survivine se fait notamment par transcription réverse de l'ARN messager suivie d'une réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR). Une étude a montré que ce dosage avait une grande sensibilité (94%) ainsi qu'une grande spécificité (95%) chez les patients atteints de TVNIM (Moussa *et al*, 2006). Une autre étude, utilisant un système de détection par transfert de protéines (Western Blot), a montré l'association de niveaux urinaires élevés de survivine avec un plus haut risque de cancer de la vessie 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 (Shariat *et al*, 2004).

La survivine se présente donc comme un bon marqueur pour le diagnostic et la surveillance des cancers de la vessie mais des études plus poussées sont encore nécessaires (Vrooman & Witjes, 2008; Van Tilborg *et al*, 2009).

4.8. ANTIGÈNE LEWIS X

L'antigène Lewis X fait partie d'un des systèmes de groupe sanguin, le système Lewis. Les antigènes de groupes sanguins sont des carbohydrates liés à la surface des érythrocytes. On les trouve également dans certains tissus épithéliaux, notamment l'urothélium. Lors de la transformation des cellules urothéliales en cellules tumorales, des changements dans la composition en carbohydrates de la membrane entraînent l'absence de certains antigènes normalement présents (comme les antigènes A, B et H) et à l'inverse, l'expression d'autres antigènes comme l'antigène Lewis X. En effet, des études immunohistochimiques ont permis de montrer la présence de l'antigène Lewis X (absent dans l'urothélium normal) dans plus de 90% des tumeurs urothéliales, indépendamment du grade et du stade de la tumeur (Cordon-Cardo *et al*, 1988; Sheinfeld *et al*, 1992).

L'antigène Lewis X est détecté dans l'urine par une technique d'immunocytologie grâce à un anticorps monoclonal (Golijanin *et al*, 1995). En comparaison à la cytologie, il présente une meilleure sensibilité (80%) et une bonne spécificité (86%). Cependant, seul un nombre réduit d'études a été conduit sur ce marqueur. Il est donc nécessaire que d'autres études confirment ses performances (Lokeshwar *et al*, 2005b; van Rhijn *et al*, 2005; Shariat *et al*, 2008).

4.9. MARQUEURS NON PROTÉIQUES

Bien que l'objet principal de cette thèse soit les biomarqueurs protéiques, il existe également des marqueurs urinaires non protéiques présentant un intérêt dans le cancer de la vessie. Cette section présente quelques exemples de ce type de biomarqueurs.

4.9.1. UROVYSION™

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 d'hybridation *in situ* en fluorescence ou FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Il existe un kit commercialisé par Abbott (www.abbottmolecular.com) : UroVysion™. Ce kit contient des sondes d'ADN qui détectent l'aneuploidie dans les chromosomes 3, 7 et 17 ainsi que la perte du locus 9p21 à partir d'échantillons urinaires.

Dans la plupart des études comparatives, le test UroVysion™ montre une sensibilité supérieure à celle de la cytologie. Sa sensibilité augmente lorsque les stades de tumeurs sont avancés mais elle reste faible pour les stades inférieurs (36% à 57%) et les bas grades (62% à 65%). 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 (Lokeshwar *et al*, 2005b; Campos-Fernandes *et al*, 2007; Shariat *et al*, 2008; Van Tilborg *et al*, 2009).

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 (Budman *et al*, 2008).

4.9.2. MICROSATELLITES

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. Les mutations peuvent également être la cause d'une instabilité des microsatellites (Shariat *et al*, 2008).

Dans une étude prospective, l'analyse dans l'urine des marqueurs de microsatellites (*microsatellite analysis*, MSA) 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 (Seripa *et al*, 2001; Parker & Spiess, 2011). La technique d'analyse de microsatellites présente également une spécificité élevée. Quant à son intérêt pronostique, il n'a pas encore été établi de corrélation entre la perte d'hétérozygotie et le risque de progression tumorale (Campos-Fernandes *et al*, 2007).

4.9.3. TÉLOMÉRASE

Les télomères sont des séquences répétées d'ADN situées aux extrémités des chromosomes. Chaque division cellulaire entraîne une perte de ces séquences, 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. Elle permet donc de maintenir la stabilité des chromosomes, rendant ainsi 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 (Shay & Bacchetti, 1997).

Concernant le cancer de la vessie, une activité télomérasique a été démontrée dans les cellules exfoliées dans l'urine (Kinoshita *et al*, 1997). La détection se fait par une méthode de PCR appelée TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*). Cette technique doit être effectuée dans un laboratoire spécialisé (Hou *et al*, 2001; Vrooman & Witjes, 2008).

Une revue systématique des études de certains marqueurs du cancer de la vessie 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 (Glas *et al*, 2003).

4.9.4. MICROARN

Les microARN sont des acides ribonucléiques (ARN) courts (entre 21 et 25 nucléotides) et non codants. Ce sont des régulateurs de gènes : ils s'apparient à des séquences complémentaires de l'ARN messager, entraînant la dégradation de ce dernier ou la répression traductionnelle. Le rôle des microARN dans la tumorigenèse a été montré dans plusieurs études, notamment des activités d'oncogène ou gène suppresseurs de tumeurs (Zhang *et al*, 2007).

Une méta-analyse de 14 études portant sur le potentiel des microARN comme biomarqueur du cancer de la vessie a montré une sensibilité globale de 71% et une spécificité globale de 75% pour la détection de la pathologie. Elle a également montré que les performances diagnostiques étaient améliorées lorsque plusieurs microARN sont évalués en combinaison, en comparaison aux performances de microARN individuels (Ding *et al*, 2015). L'intérêt de ce type de marqueur a été confirmé dans une étude récente identifiant un panel de microARN permettant la détection du cancer de la vessie en corrélation avec le stade de progression de la tumeur (Long *et al*, 2015).

Initialement, les microARN étaient détectés et quantifiés par la méthode de transfert d'ARN (Northern blot). Cependant, celle-ci demande une grande quantité d'ARN et n'est donc pas totalement adéquate pour les microARN. Des méthodes alternatives, plus sensibles et nécessitant une plus faible quantité d'ARN, sont donc maintenant utilisées telle que la RT-PCR ou la détection par fluorescence induite par laser. Cette dernière utilise deux sondes d'acides nucléiques marquées par des fluorophores différents s'apparient chacune à une partie du microARN. La quantification est alors possible grâce à un scanner confocal à deux couleurs. Enfin, des puces à microARN ont également été développées, permettant une analyse simultanée d'un grand nombre de microARN mais cette méthode reste seulement semi-quantitative (Neely *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2007).

4.10. RÉSUMÉ DES CARACTÉRISTIQUES ET DES PERFORMANCES DES BIOMARQUEURS

Le Tableau 4-1 résume les caractéristiques des marqueurs mentionnés ci-dessus (à l'exception des microARN). Il regroupe les données de plusieurs sources : le rapport d'une méta-analyse de l'agence américaine *Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ) incluant 57 études (dans 60 publications) (Chou *et al*, 2015) ainsi que deux revues de littérature concernant principalement les marqueurs urinaires du cancer de la vessie dans la cadre de la détection de la récurrence (van Rhijn *et al*, 2005; Shariat *et al*, 2008). On note un fort écart des valeurs de sensibilité du test UroVysion™ entre la

méta-analyse et la revue de van Rhijn *et al.*. Cet écart peut être dû à la différence de méthodes d'analyse statistique utilisée et au nombre d'études prises en compte (11 pour la méta-analyse et seulement 4 pour la revue).

De façon générale, les marqueurs actuellement étudiés et présentés dans ce chapitre ont une sensibilité augmentée en comparaison à la cytologie urinaire mais manquent souvent de spécificité. Actuellement, il n'y a aucun marqueur suffisamment performant pour remplacer la cytologie urinaire et la cystoscopie qui restent les examens de référence 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) (Diamandis, 2004; Budman *et al*, 2008).

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 quel que soit le stade de la tumeur. Dans ce contexte, on privilégie une bonne sensibilité au détriment de la spécificité.

À l'inverse, dans le cadre d'un suivi de patients atteints 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) (Diamandis, 2004).

Tableau 4-1. Performances des marqueurs urinaires du cancer de la vessie

Marqueur ou test	Référence	Diagnostic primaire		Surveillance (diagnostic de la récidive)		Avantages	Inconvénients
		Se (%)	Sp (%)	Se (%)	Sp (%)		
BTA-TRAK™	1	76 [61-87]	53 [38-68]	58 [46-69]	79 [72-85]		Influencé par les affections génito-urinaires bénignes
BTA-stat™	1	76 [67-83]	78 [66-87]	60 [55-65]	76 [69-83]	Test rapide	Influencé par les affections génito-urinaires bénignes
NIMP22*	1	67 [55-77]	84 [75-90]	61 [49-71]	71 [60-81]	Insensible au traitement par BCG Détection des tumeurs de bas grade	Pas de valeur seuil clairement définie Influencé par les affections génito-urinaires bénignes
ImmunoCyt™	1	85 [78-90]	83 [77-87]	75 [64-83]	76 [70-81]		Forte variabilité inter-observateur Nécessité d'opérateurs qualifiés
BLCA-4	3	-	-	89-96	100	Bonnes sensibilité et spécificité	Nécessité d'études plus poussées
CYFRA 21-1	2	-	-	85 [75-88]	82 [73-95]		Influencé par les affections génito-urinaires bénignes et les instillations
UBC®	2	-	-	60 [21-80]	87 [72-95]		Nécessité d'études plus poussées
HA-HAase	3	-	-	92-100	89-93	Détection des tumeurs de bas grade	Nécessité d'études plus poussées
Survivine	3	-	-	64-100	87-93	Bonnes sensibilité et spécificité	Nécessité d'études plus poussées
Antigène Lewis X	2	-	-	75 [68-79]	85 [67-86]		Nécessité d'études plus poussées
UroVysion™	1 2	73 [50-88] -	95 [87-98] -	55 [36-72] 79 [70-86]	80 [66-89] 70 [66-93]	Insensible au traitement par BCG	Nécessité d'opérateurs qualifiés Coûteux
Microsatellites	2	-	-	82 [75-92]	89 [79-100]	Détection des tumeurs de bas grade	Complexe et coûteux
Télomérase	3	-	-	62-81	80-96	Bonnes sensibilité et spécificité	Influencé par l'inflammation et l'âge

*test quantitatif uniquement

Se, sensibilité ; Sp, spécificité

Références : 1 - Chou *et al*, 2015 : les valeurs en noir sont issues d'une méta-analyse et les valeurs entre crochets [] correspondent à l'intervalle de confiance à 95%
2 - van Rhijn *et al*, 2005 : les valeurs en noir sont les médianes et celles entre crochets [] correspondent aux valeurs minimales et maximales
3 - Shariat *et al*, 2008 : les valeurs en noir sont les valeurs minimales et maximales

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. Ainsi, le rapport de l' AHRQ a mis en avant 16 études démontrant une meilleure sensibilité d'une combinaison de plusieurs marqueurs avec la cytologie urinaire en comparaison au biomarqueur seul (81% et 69% respectivement) (Chou *et al*, 2015). Plusieurs panels de biomarqueurs ont été proposés ces dernières années pour le diagnostic du cancer de la vessie ou la détection de sa récurrence. Ainsi, l'équipe de S. Goodison a publié plusieurs études sur ce sujet (Goodison *et al*, 2012; Urquidi *et al*, 2012; Rosser *et al*, 2013, 2014b) et a notamment établi un panel de 10 biomarqueurs présentant des meilleures performances diagnostiques que les biomarqueurs individuels : le panel a une aire sous la courbe ROC (AUC) de 0,904 ainsi qu'une sensibilité de 79% et une spécificité de 88% pour la détection de la récurrence du cancer de la vessie (Rosser *et al*, 2014a).

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 (Compton, 2007; Hamburg & Collins, 2010). 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 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 (Diamandis *et al*, 2010).

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 (European Commission Health Research Directorate, 2012).

Ce projet est décrit plus précisément dans le prochain chapitre.

Chapitre 5. Le projet européen DIPROMON

1. DESCRIPTION DU PROJET

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans un projet européen intitulé DIPROMON (*Multimodular biomarker analysis workflow for Diagnosis, PROgnosis and MONitoring of drug treatment response in bladder cancer*). C'est un projet approuvé par l'Union Européenne et financé par le 7ème 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) et trois entreprises : Lionex (Allemagne), OnkoTec (Autriche) et emergentec biodevelopment (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 (Sang-Hoon Cho, 2012).

En raison de l'hétérogénéité des cancers dans leur présentation clinique et leur réponse aux traitements, la médecine personnalisée s'applique tout particulièrement au domaine de la cancérologie. 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, le projet 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 plateforme technologique sera alors développée pour permettre la mesure de ces profils dans un cadre clinique. La plateforme 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. L'ensemble des règles sera validé par une étude clinique. Les principales étapes du projet sont résumées dans la Figure 5-1 ci-dessous.

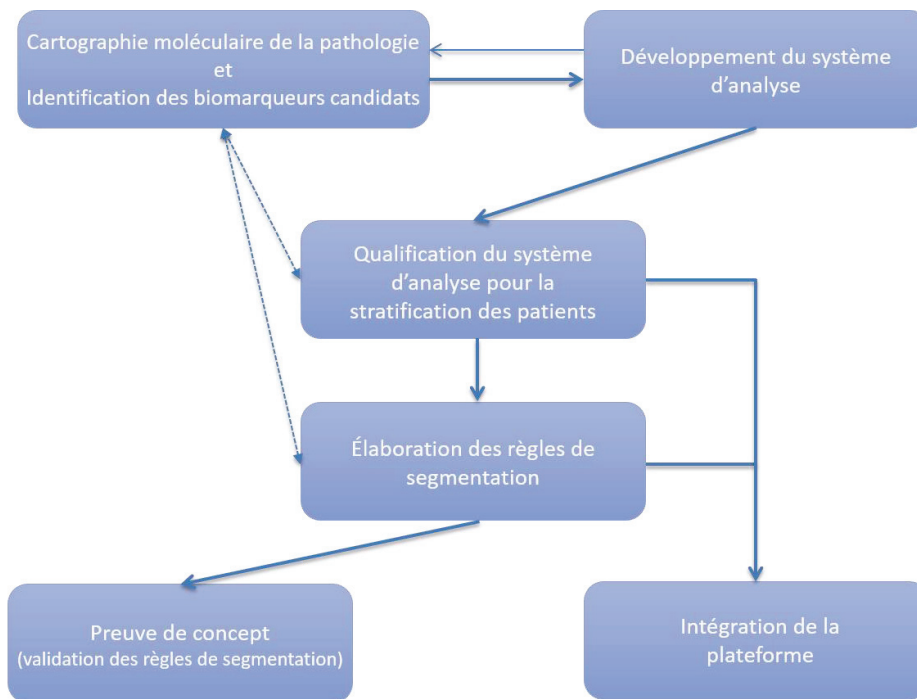


Figure 5-1. Diagramme des principales étapes du projet DIPROMON (adapté de University of Surrey Guildford, 2013)

Les principaux objectifs du projet DIPROMON sont donc :

- 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).

2. LE RÔLE D'AXO SCIENCE

AXO Science (www.axoscience.com) 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 support (Figure 5-2). Cette technologie permet la mise au point de tests multiparamétriques sous la forme d'une plaque de microtitration 96-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.

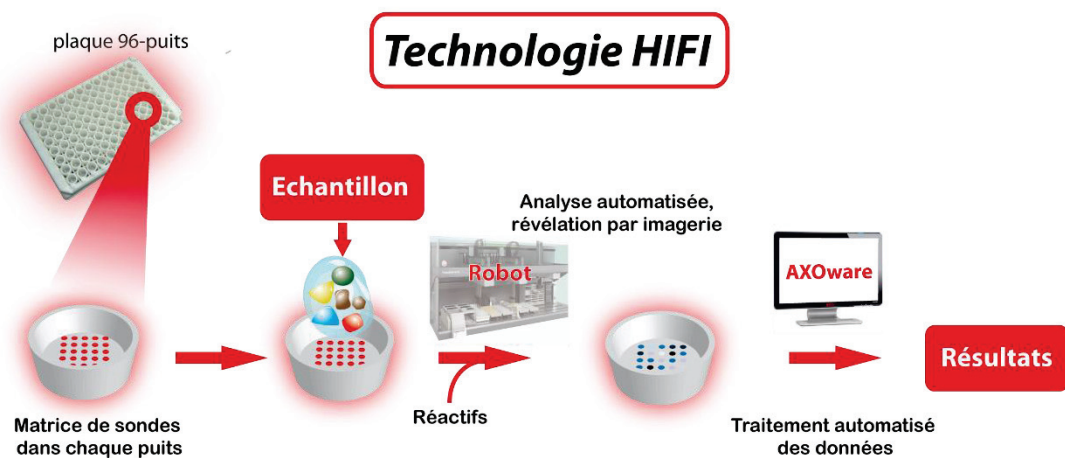


Figure 5-2. Principe de la technologie HIFI

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 urinaires. Nous avons également participé en amont à la sélection et la validation de panels de biomarqueurs.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chapitre 6. Matériels

1. RÉACTIFS

1.1. CIBLES

1.1.1. MARQUEURS

Tous les marqueurs sont des protéines humaines recombinantes à l'exception d'EN2 (peptide synthétique de 100 acides aminés).

CDH1 (Cadhérine 1)	R&D Systems
EGFR (Récepteur du facteur de croissance épidermique)	R&D Systems
EN2 (<i>Engrailed-2</i>).....	Bio-Synthesis
ErbB2 (Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique)	R&D Systems
IL6 (Interleukine 6)	eBioscience
IL8 (Interleukine 8)	BioLegend
IL10 (Interleukine 10)	eBioscience
MMP9 (Métalloprotéase matricielle 9).....	R&D Systems
PTGS2 (<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>) (AA 1-604)	Abnova
PTGS2 (AA 187-425)	Cloud-Clone Corp.
PTGS2.....	Lionex
VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)	R&D Systems

1.1.2. ÉCHANTILLONS

Échantillons urinaires de patients atteints de cancer de la vessie... University of Surrey (Royaume-Uni)
 Échantillons urinaires de donneurs sains..... University of Surrey (Royaume-Uni)

1.2. ANTICORPS

1.2.1. ANTICORPS DE CAPTURE

Anti-CDH1 (IgG, monoclonal clone 77308, développé chez la souris)	R&D Systems
Anti-EGFR (IgG, polyclonal, développé chez la chèvre).....	R&D Systems
Anti-ErbB2 (IgG, monoclonal clone 191924, développé chez la souris).....	R&D Systems
Anti-IL6 (IgG, polyclonal, développé chez la souris).....	eBioscience
Anti-IL8 (IgG, monoclonal clone H8A5, développé chez la souris).....	BioLegend
Anti-IL8 (IgG, polyclonal, développé chez le lapin)	Lionex
Anti-IL10 (IgG, monoclonal clone JES3-9D7, développé chez la souris).....	eBioscience
Anti-MMP9 (IgG, monoclonal clone 36020, développé chez la souris)	R&D Systems
Anti-PTGS2 (IgG, monoclonal clone AS66, développé chez la souris).....	Abnova
Anti-VEGF (IgG, monoclonal clone 26503, développé chez la souris).....	R&D Systems

1.2.2. ANTICORPS DE DÉTECTION

Anticorps biotinylés :

Anti-CDH1 (IgG, polyclonal, développé chez la chèvre)	R&D Systems
Anti-EGFR (IgG, polyclonal, développé chez la chèvre).....	R&D Systems
Anti-ErbB2 (IgG, polyclonal, développé chez la chèvre)	R&D Systems
Anti-IL6 (IgG, monoclonal clone MQ2-39C3, développé chez la souris)	eBioscience
Anti-IL8 (IgG, monoclonal clone E8N1, développé chez la souris)	BioLegend
Anti-IL10 (IgG, monoclonal clone JES3-12G8, développé chez la souris).....	eBioscience
Anti-MMP9 (IgG, polyclonal, développé chez la chèvre)	R&D Systems
Anti-PTGS2 (IgG, polyclonal, développé chez le lapin).....	Bioss Antibodies
Anti-VEGF (IgG, polyclonal, développé chez la chèvre).....	R&D Systems

Anticorps de détection non conjugués :

Anti-EN2 (IgG, monoclonal, développé chez la souris)	Antibody Production Services
Anti-PTGS2 (IgG, polyclonal, développé chez le lapin).....	Abcam

1.2.3. ANTICORPS SECONDAIRES

Anticorps conjugués à la phosphatase alcaline :

Anti-IgG de lapin (polyclonal, développé chez la chèvre)	Sigma-Aldrich
Anti-IgG de lapin (monoclonal clone RG-96, développé chez la souris)	Sigma-Aldrich

Anticorps conjugués à la peroxydase de raifort :

Anti-IgG de souris (polyclonal, développé chez la chèvre).....	Sigma-Aldrich
Anti-IgG de lapin (polyclonal, développé chez la chèvre)	Sigma-Aldrich

1.3. AUTRES RÉACTIFS

1.3.1. SOLVANTS, RÉACTIFS CHIMIQUES ET AUTRES PRODUITS

Albumine de sérum bovin (BSA).....	Sigma-Aldrich
BCIP/NBT solution prête à l'emploi.....	Sigma-Aldrich
LowCross-Buffer®	Candor Bioscience
Peroxydase de raifort conjuguée à la streptavidine.....	Sigma-Aldrich
Phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine	Sigma-Aldrich
Séquence d'oligonucléotides (5'→3') biotine-(dT) ₁₆ -C ₆ -NH ₂	Eurogentec
Solution d'arrêt de réaction Stop Reagent for TMB Substrate for ELISA	Sigma-Aldrich
Solution de révélation par colorimétrie sciCOLOR T2	Scienion
TMB Liquid Substrate System for ELISA	Sigma-Aldrich
Urine normale humaine	UTAK Laboratories

1.3.2. TAMPONS

Tampons de dépôt des sondes :

Tampon d'immobilisation 2X	AXO Science
(Acétate de sodium 0,1 M ; chlorure de potassium 0,1 M ; bleu de bromophénol 2 mg/mL ; pH 5,5)	
sciSPOT Protein	Scienion

PBS (phosphate buffered saline), pastilles, pH 7,4.....AppliChem

2. SUPPORTS

Adhésif TKL AXO Science
 Plaques 96-puits sans fond..... Greiner Bio-One
 Plaques 96-puits à fond plat, transparents Thermo Scientific
 Plaques 96-puits (8 barrettes de 12 puits) sciPLEXPLATES type 2 Scienion
 Plaques 96-puits (8 barrettes de 12 puits) GREINER MICROLON® 200..... Greiner Bio-One

3. TROUSSES ELISA

Toutes les trousse ELISA sont destinées à la détection de protéines humaines.

Tableau 6-1. Trousses ELISA utilisées lors de la sélection de biomarqueurs

Marqueur	Nom complet	Fournisseur (référence)
AP1M2	<i>Adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit</i>	Cusabio (CSB-EL001865HU)
BIRC5	Survivine (<i>Baculoviral IAP repeat containing 5</i>)	Abnova (KA0441)
CD44	Classe de différenciation 44	Abnova (KA0119)
CDH1	Cadhérine 1	Abnova (KA0433)
DCN	Décorine	Abcam (ab99998)
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique	Sigma-Aldrich (RAB0160-1KT)
EN2	<i>Engrailed-2</i>	Cusabio (CSB-EL007660HU)
ErbB2 (HER2)	Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique	Sigma-Aldrich (RAB0173-1KT)
FBLN3	Fibuline-3	USCN Life Science (SEF422Hu)
FGFR3	Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes 3	Cusabio (CSB-EL008646HU)
IL8	Interleukine 8	Abcam (ab46032)
MMP9	Métalloprotéase matricielle 9	Abcam (ab100610)
MYC	<i>V-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	BlueGene Biotech (E01C0774)
p53	Antigène tumoral p53	Sigma-Aldrich (RAB0500-1KT)
PTGS2 (COX2)	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i> (cyclooxygénase 2)	USCN Life Science (SEA699Hu)
RARB	Récepteur bêta de l'acide rétinoïque	USCN Life Science (SED951Hu)
TMOD1	Tropomoduline 1	Cusabio (CSB-EL023909HU)
UPK3A	Uroplakine 3A	Cusabio (CSB-EL025657HU)
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	Cusabio (CSB-E11718H)
VIM	Vimentine	Abnova (KA3127)

4. INSTRUMENTS

Appareil de dépôt non-contact sciFLEXARRAYER S3	Scienion
Automate de pipetage Freedom EVO® 75	TECAN
Automate de pipetage Freedom EVO® 100	TECAN
Bloc chauffant et agitateur Eppendorf Thermomixer® confort	Eppendorf
Bloc chauffant CPAC Ultraflat HT 2-TEC	Inheco
Bloc chauffant EchoTherm™	Torrey Pines Scientific
Laveur de plaques HydroFlex™	TECAN
Laveur de plaques HydroSpeed™	TECAN
Lecteur de plaques Infinite® M200	TECAN
Lecteur de plaques CLAIR (Colorimetric Array Imaging Reader)	Sensovation

5. LOGICIELS

AXOware	AXO Science
Freedom EVOware®	TECAN
Outil d'analyse de données ELISA	elisaanalysis.com
Outil de création de panels de biomarqueurs	PanelomiX

Chapitre 7. Méthodes

Plusieurs types d'immunoessais ont été réalisés. La majorité des tests est en format sandwich.

La première partie concerne les immunoessais classiques réalisés avec les trousse ELISA. La seconde partie décrit les méthodes développées pour des immunoessais multiparamétriques et automatisés sur divers supports.

1. IMMUNOESSAIS CLASSIQUES

1.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons urinaires de patients et de donneurs sains ont été analysés tels que reçus. Ces échantillons ont été recueillis selon la procédure du centre hospitalier : le premier jet d'urine est collecté puis centrifugé à 150g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite aliquoté et stocké à -80°C.

1.2. PRINCIPE GÉNÉRAL

Toutes les trousse ELISA utilisées reposent sur le même principe d'immunoessai de type sandwich décrit dans la Figure 7-1. Les plaques de microtitration fournies ont déjà subi une étape de *coating* des anticorps de capture. Chaque trousse contient également tous les réactifs nécessaires à l'analyse. Les réactifs ont été préparés et dilués selon les instructions du fournisseur.

Les tests ont été réalisés avec l'automate de pipetage Freedom EVO® 75 ou Freedom EVO® 100, selon le nombre d'échantillons à analyser. Ce dernier possède un bras manipulateur pour déplacer les plaques de microtitration et les couvercles, un bras pipetteur pour transférer les solutions des réservoirs à la plaque par aspiration et éjection ainsi qu'un bloc chauffant pour l'incubation des plaques. L'instrument est également associé à une station de lavage pour le rinçage des puits et à un lecteur de plaques.

Une fois la plaque placée dans l'automate de pipetage, le protocole est donc entièrement automatisé. Il implique les étapes suivantes : les échantillons d'urine et le diluant sont transférés à la plaque de microtitration (50 µL de chaque, pour un total de 100 µL/puits). Les paramètres de l'incubation varient selon les trousse : de 30 minutes à 2,5 heures, à température ambiante ou à 37°C. La solution d'anticorps de détection biotinylé est ensuite incubée (100 µL/puits, 30 minutes ou 1 heure, à température ambiante ou à 37°C) puis il y a incubation de la solution de streptavidine marquée par la peroxydase de raifort (100 µL/puits, 30 minutes ou 1 heure, à température ambiante ou à 37°C). Enfin, l'ajout du substrat TMB (50 µL à 100 µL/puits, 10 à 15 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière) permet la génération du signal colorimétrique. La réaction enzymatique est ensuite stoppée

par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique à une concentration de 0,2 M, pH 1,5 (50 µL à 100 µL/puits).

Entre chaque étape du protocole et jusqu'à l'ajout du TMB, un lavage des puits par du PBS (3 x 300 µL/puits) est réalisé pour éliminer les molécules non capturées.

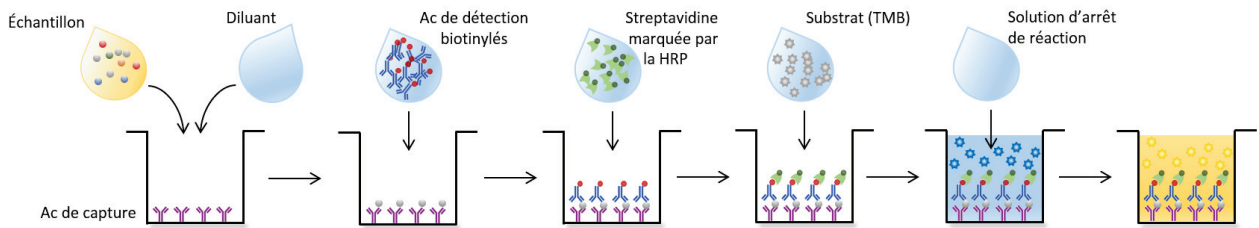


Figure 7-1. Protocole général des immunoessais de type sandwich des troussees ELISA. Ac, anticorps ; HRP, peroxydase de raifort ; TMB, 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

Ces troussees ELISA sont utilisées pour la sélection de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie. Une fois les marqueurs sélectionnés, une plateforme d'immunoessais multiparamétriques est développée pour leur détection (voir la Section 2 ci-dessous). Un seul marqueur sélectionné n'est pas intégré à cette plateforme. Le marqueur EN2 possède en effet son propre immunoessai monoparamétrique en mode direct. Le protocole est décrit dans la Figure 7-2. La première étape est le *coating* des fonds de puits de plaques en polystyrène par l'échantillon d'urine (50 µL dilué dans 50 µL de PBS/puits). L'échantillon est ainsi incubé 2 heures à température ambiante. Il y ensuite ajout de la solution d'anticorps de détection marqué par la peroxydase de raifort (à une concentration de 1,5 µg/mL dans du Low-Cross® Buffer, 100 µL/puits, 30 minutes à température ambiante). Enfin, l'ajout du substrat TMB (100 µL/puits, 10 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière) permet la génération du signal colorimétrique. La réaction enzymatique est ensuite stoppée par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique (50 µL/puits). Entre chaque étape du protocole et jusqu'à l'ajout du TMB, un lavage des puits par du PBS (3 x 300 µL/puits) est réalisé pour éliminer les molécules non capturées.

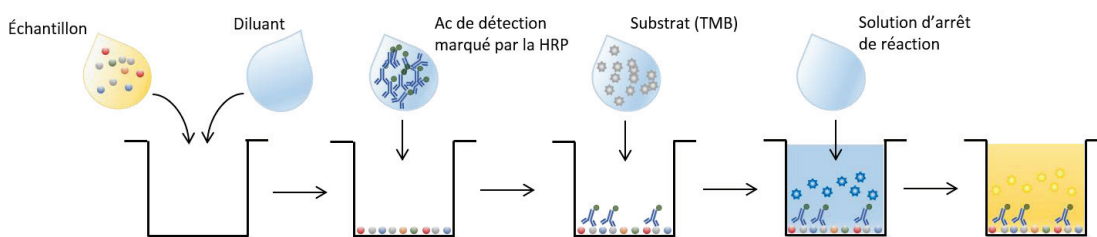


Figure 7-2. Protocole de l'immunoessai en mode direct pour la détection du marqueur EN2. Ac, anticorps ; HRP, peroxydase de raifort ; TMB, 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

1.3. GÉNÉRATION ET ANALYSE DES SIGNAUX

Le signal colorimétrique est généré grâce à la peroxydase de raifort qui catalyse l'oxydation du TMB. Cette réaction se fait en deux étapes (Figure 7-3) : le produit intermédiaire est un complexe à transfert de charges de couleur bleue. L'ajout d'acide sulfurique permet l'arrêt de la réaction mais également la conversion du produit d'oxydation bleu en un dérivé jaune (diimine).

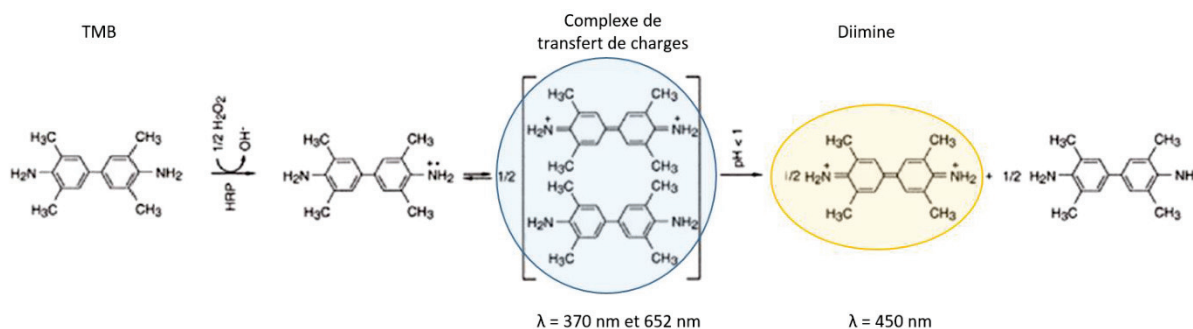


Figure 7-3. Réaction du TMB catalysée par la peroxydase de raifort. HRP, peroxydase de raifort ; TMB, 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

L'intensité de la coloration jaune est mesurée grâce au lecteur de plaques Infinite® M200. La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde de 450 nm. Les courbes d'étalonnage de la concentration en protéine en fonction de la densité optique sont ensuite générées. Ces courbes sont ajustées par régression logistique à 4 paramètres. L'équation suivante est utilisée :

$$y = a + \frac{(d - a)}{1 + (x/c)^b}$$

où a, b, c et d sont les paramètres du modèle, x correspond à la variable explicative (la concentration en protéine) et y correspond à la variable réponse (la densité optique). Les paramètres a et d sont les paramètres d'asymptote (le minimum et le maximum respectivement). Le paramètre b correspond à la pente et le paramètre c à l'abscisse du point de mi-pente dont l'ordonnée est (a+b)/2.

La courbe ajustée est ensuite utilisée pour déterminer la concentration en protéines des échantillons urinaires grâce à la formule inverse :

$$x = c \left(\frac{a - d}{y - d} - 1 \right)^{1/b}$$

2. IMMUNOESSAIS MULTIPARAMÉTRIQUES

La puce à protéines a été développée sur deux supports : le développement a débuté avec une plaque de microtitration 96-puits à fond adhésif puis la deuxième partie du développement s'est faite avec

une plaque de microtitration 96-puits à fond en polystyrène. Les méthodes de préparation et les protocoles sont similaires pour les deux supports. Les différences sont détaillées dans les sections ci-dessous.

2.1. PRÉPARATION DES PUCES

Des matrices de plots ont été réalisées en fond de puits de plaques de microtitration grâce à l'automate de dépôt non-contact sciFLEXARRAYER S3. Pour les plaques à fond adhésif, l'adhésif TKL est assemblé à une plaque 96-puits sans fond avant le dépôt des sondes.

Les sondes sont préalablement préparées et déposées dans une plaque 384-puits. Elles sont diluées dans un tampon de dépôt : le tampon d'immobilisation 2X a été utilisé pour les immunoessais sur plaque à fond adhésif et le tampon sciSPOT Protein de Scienion a été utilisé pour les immunoessais sur plaque à fond en polystyrène. Le matricage s'effectue ensuite par prélèvement par l'automate des sondes dans la plaque 384-puits et éjection de gouttes de très faible volume sur le support à des coordonnées prédéfinies et précises. Chaque plot a un volume moyen de 350 pL et tous les plots sont espacés de 400 µm.

La matrice forme un carré de 7x7 plots au centre du puits (Figure 7-4). En plus des plots d'anticorps de capture, chaque matrice contient des plots de contrôle positif : des oligonucléotides biotine-(dT)₁₆-C₆-NH₂ dilués dans le tampon de dépôt à une concentration de 50 µM. La présence de la biotine permet l'interaction avec l'enzyme marquée par la streptavidine lors de l'immunoessai. La matrice contient également des plots de contrôle négatif (dilution du tampon de dépôt dans de l'eau) et des plots d'albumine de sérum bovin (solution diluée dans le tampon de dépôt à une concentration de 0,5 mg/mL) pour identifier certaines interactions non-spécifiques de réactifs.

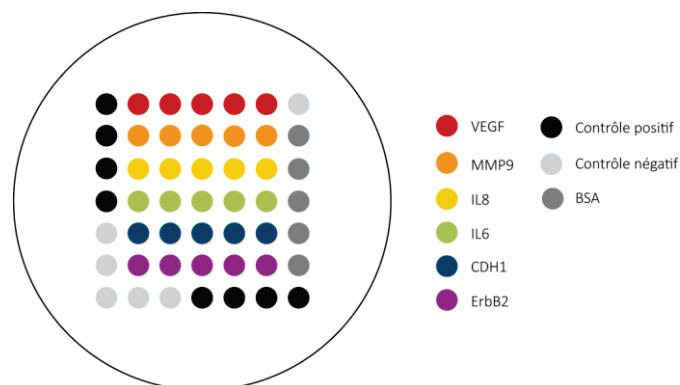


Figure 7-4. Exemple de matrice déposée en fond de puits. À l'exception des plots de contrôle et de BSA, tous les plots correspondent aux anticorps de capture dirigés contre les protéines indiquées.

Une fois les matrices réalisées, les plaques sont stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.2. PROTOCOLES DES IMMUNOESSAIS

Les immunoessais multiparamétriques de type sandwich ont été réalisés avec l'automate de pipetage Freedom EVO® 75. Le protocole, décrit dans la Figure 7-5, est donc entièrement automatisé et implique les étapes suivantes : les puits sont d'abord saturés par du Low-Cross® Buffer (200 µL/puits, 10 minutes, à 37°C). La saturation permet de minimiser les interactions non-spécifiques. L'échantillon (protéine de calibration ou échantillon urinaire de patient) et les anticorps de détection biotinylés sont ensuite incubés en une seule étape (25 µL d'échantillon et 50 µL de la solution d'anticorps /puits, pendant 2 heures, à 37°C). Il y a ensuite l'incubation de la streptavidine marquée par l'enzyme : pour les immunoessais sur plaque à fond adhésif il s'agit de la phosphatase alcaline et pour les immunoessais sur plaque à fond en polystyrène il s'agit de la peroxydase de raifort. Pour les deux types d'immunoessais, la streptavidine marquée par l'enzyme est utilisée à une concentration de 2 µg/mL et 100 µL de la solution sont incubées par puits pendant 30 minutes à 37°C. Toutes les solutions sont préparées dans du Low-Cross® Buffer, à l'exception des protéines de calibration qui sont préparées dans de l'urine humaine.

La dernière étape correspond à l'incubation du substrat pour la génération du signal colorimétrique. Le substrat utilisé est le BCIP/NBT pour les immunoessais sur plaque à fond adhésif et le sciCOLOR T2 (contenant du TMB) pour les immunoessais sur plaque à fond en polystyrène. Pour les deux types d'immunoessais, le substrat est une solution prête à l'emploi et 100 µL de solution sont incubés par puits. L'incubation dure 30 minutes à 37°C pour le BCIP/NBT tandis qu'elle est de 15 minutes à température ambiante pour le sciCOLOR T2. Entre chaque étape du protocole, un lavage des puits par du PBS (3 x 300 µL/puits) est réalisé pour éliminer les molécules non capturées. Pour les immunoessais sur plaque à fond en polystyrène, il n'y a pas de lavage après l'incubation du sciCOLOR T2 mais seulement aspiration de la solution. À la fin du protocole, les puits sont séchés (10 à 15 minutes à 65°C) avant l'acquisition des images.

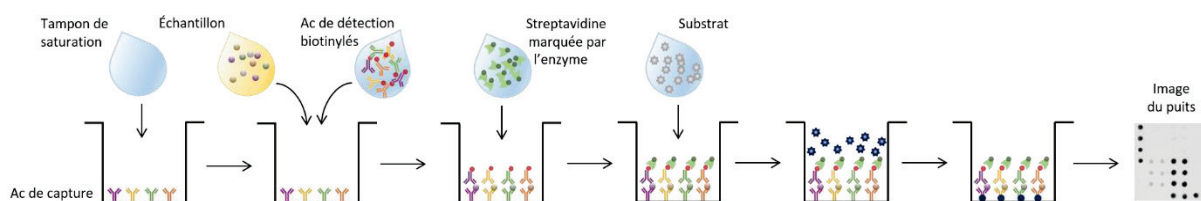


Figure 7-5. Protocole des immunoessais multiparamétriques de type sandwich. L'enzyme et le substrat utilisés varient selon le support de l'immunoessai. La réaction enzymatique forme des produits insolubles qui précipitent au niveau des plots.

2.3. GÉNÉRATION ET ANALYSE DES SIGNAUX

Pour les immunoessais sur plaque à fond adhésif, le signal colorimétrique est généré grâce à la phosphatase alcaline qui catalyse la déphosphorylation du BCIP (Figure 7-6). L'intermédiaire ainsi formé est oxydé par le NBT. Il y a alors formation de deux produits insolubles. Ainsi, la combinaison de deux produits de réaction forme un précipité bleu-violet à la position de sa production, c'est-à-dire sur les plots marqués par la phosphatase alcaline.

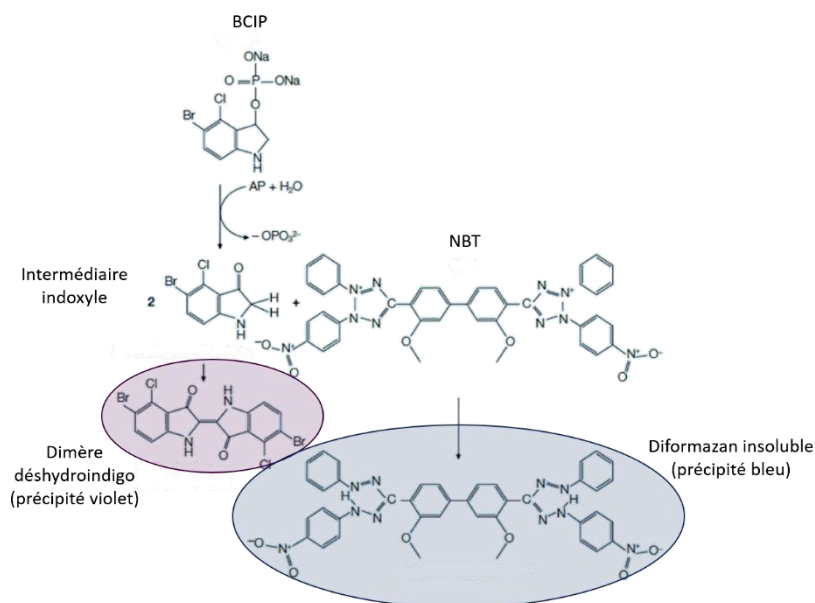


Figure 7-6. Génération du signal colorimétrique par la phosphatase alcaline. BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate; NBT, bleu de nitrotétrazolium

Concernant les immunoessais sur plaque à fond en polystyrène, le signal colorimétrique est généré grâce à la peroxydase de raifort qui catalyse l'oxydation du TMB (Figure 7-3), permettant la formation d'un précipité violet au niveau des plots marqués par l'enzyme.

À la fin du protocole, les plaques sont transférées au lecteur de plaques CLAIR pour l'acquisition des images de chaque puits. Ces images sont ensuite analysées par le logiciel AXOware qui quantifie les intensités de chaque plot en utilisant une échelle de niveaux de gris allant de 0 à 255 unités arbitraires. Pour chaque sonde, l'intensité est ensuite corrigée par la formule suivante :

$$\text{intensité} = \left(\frac{(255 - \text{niveau de gris de la sonde}) - (\text{niveau de gris local du BSA}) + 1}{\text{niveau de gris local du contrôle positif}} * 100 \right) - \text{niveau de gris moyen des puits blancs}$$

Le niveau de gris de la sonde correspond à la moyenne des niveaux de gris des plots de cette sonde. Le niveau de gris local du contrôle BSA correspond au niveau de gris moyen des plots de BSA du puits et le niveau de gris local du contrôle positif correspond au niveau de gris moyen des plots de contrôle positif du puits. La moyenne des puits blancs correspond à la moyenne des niveaux de gris des plots

de la sonde dans les puits blancs du test (contenant de l'urine humaine normale sans ajout de protéine).

Les courbes d'étalonnage de la concentration en protéine en fonction de l'intensité corrigée sont ensuite générées. Ces courbes sont ajustées par régression logistique à 4 paramètres et sont utilisées pour déterminer la concentration en protéines des échantillons urinaires (selon les formules décrites en 1.3).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Comme il a été présenté précédemment dans l'étude bibliographique, il existe un besoin d'optimisation de la prise en charge du cancer de la vessie, plus particulièrement au niveau de la surveillance. En effet, le fort taux de récurrence des TVNIM implique un suivi régulier par cystoscopie et cytologie urinaire. Ce suivi présente plusieurs inconvénients, dont l'aspect invasif de la cystoscopie.

De nombreuses études ont montré le potentiel des marqueurs urinaires comme alternative à la cystoscopie. Cependant, il n'existe actuellement aucun marqueur suffisamment performant pour remplacer la cytologie urinaire ou la cystoscopie ou du moins augmenter l'intervalle entre ces examens de suivi. Ainsi, pour pouvoir améliorer les performances diagnostiques, nous avons choisi une approche multiplexe en combinant plusieurs marqueurs en un panel.

Les travaux de cette thèse comprennent deux parties : la première étape consiste à la sélection des marqueurs pour établir un panel et la seconde étape concerne le développement d'une plateforme d'immunoessais multiparamétriques pour la détection et la quantification du panel.

Chapitre 8. Sélection de biomarqueurs urinaires pour le diagnostic et la récurrence des tumeurs urothéliales

Deux études ont été menées pour la sélection de biomarqueurs urinaires, elles sont présentées dans la Figure 8-1. L'étude pilote était orientée vers la sélection de marqueurs pour le diagnostic du cancer de la vessie et a abouti à la définition d'un premier panel (Panel 1) tandis que la seconde étude avait pour objectif de sélectionner des marqueurs pour la détection des récurrences du cancer de la vessie (Panel 2).

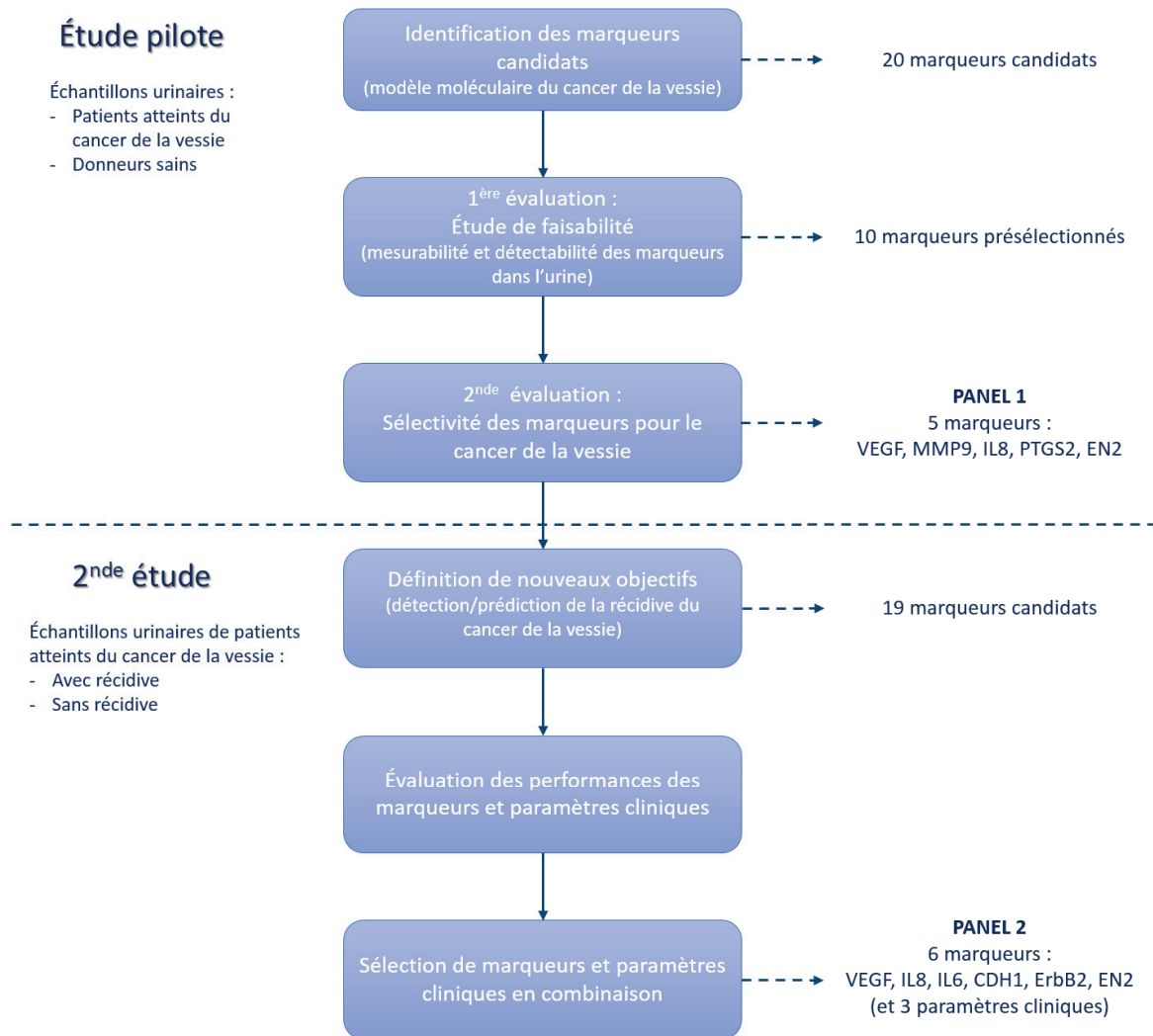


Figure 8-1. Représentation schématique des étapes de la sélection des marqueurs

1. ÉTUDE PILOTE

Cette première étude comprend deux étapes : les marqueurs ont tout d'abord été évalués pour leur mesurabilité et leur détectabilité dans un petit nombre d'échantillons puis une seconde évaluation a permis d'établir la sélectivité de certains marqueurs pour le cancer de la vessie.

1.1. IDENTIFICATION DES MARQUEURS À ÉVALUER

Les marqueurs candidats ont été sélectionnés par emergentec biodevelopment, une entreprise de bioinformatique et partenaire du projet DIPROMON. Pour cela, un modèle moléculaire du cancer de la vessie a été construit grâce à l'exploration de données (*data mining*) de la littérature concernant le cancer de la vessie. Les données ont notamment été extraites d'études « omiques » sur le cancer de la vessie, à savoir les études de transcriptomique, de protéomique et de métabolomique.

Ce modèle moléculaire concerne les TVNIM et comporte 520 protéines. Parmi ces protéines, 16 marqueurs ont été sélectionnés en se basant sur leur nombre d'associations au cancer de la vessie. Quatre autres marqueurs ne faisant pas partie du modèle ont aussi été sélectionnés car ils présentaient dans la littérature scientifique de fortes preuves de lien avec le cancer de la vessie. Les 20 marqueurs candidats sont listés dans le Tableau 8-1.

Suite à l'identification des marqueurs candidats, ces derniers ont été évalués en deux étapes.

1.2. PREMIÈRE ÉVALUATION

Il s'agit d'une étude de faisabilité. Les 20 marqueurs candidats ont été évalués dans des échantillons urinaires de patients atteints de cancer de la vessie et de donneurs sains. La mesurabilité des marqueurs a d'abord été évaluée. En effet, l'urine est une matrice biologique complexe qui peut avoir un impact négatif sur la méthode de dosage, notamment par son pH, la présence de sels et de protéines.

Cette mesurabilité est décrite dans le Tableau 8-1. Pour chaque marqueur, une gamme d'étalonnage dans le diluant de la trousse ELISA et une gamme d'étalonnage dans l'urine humaine ont été établies. Quatre des 20 dosages ELISA n'ont pas détecté leur cible dans l'urine. Il s'agit des dosages pour les marqueurs suivants : CD44, AP1M2, CDH1 et ErbB2. Une gamme d'étalonnage dans le diluant ayant été établie pour ces dosages, il est donc possible que la non-détection des cibles dans l'urine soit due à une dénaturation de la cible ou de l'anticorps par la matrice biologique.

L'étude de faisabilité avait également pour objectif d'évaluer la détectabilité des marqueurs dans des échantillons urinaires de patients atteints de cancer de la vessie. Parmi les 16 dosages montrant une mesurabilité dans l'urine, 10 ont détecté leur cible dans l'urine de patients (Tableau 8-1) : MMP9, EN2, VEGF, EGFR, IL8, DCN, MYC, UPK3A, PTGS2 et FBLN3. L'absence de détection des marqueurs pour les 6 autres dosages (VIM, RARB, FGFR3, TMOD1, BIRC5 et p53) peut être causée par les caractéristiques de la protéine de calibration pouvant différer de la protéine *in vivo* présente dans les échantillons urinaires.

Tableau 8-1. Première évaluation des marqueurs dans des échantillons urinaires

Marqueur	Gamme d'étalonnage dans le diluant	Gamme d'étalonnage dans l'urine	Limites de détection (urine)**	Détection du marqueur dans les échantillons de patients
MMP9	+	+	0,222 ng/mL	+
EN2	+	+	N/A*	+
VEGF	+	+	0,0625 ng/mL	+
VIM	+	+	28,1 ng/mL	-
CD44	+	-	N/A	-
EGFR	+	+	0,1 ng/mL	+
IL8	+	+	0,1 ng/mL	+
RARB	+	+	0,625 ng/mL	-
PTGS2	+	+	2,5 ng/mL	+
DCN	+	+	25,9 pg/mL	+
MYC	-	+	1 ng/mL	+
AP1M2	+	-	N/A	-
FGFR3	+	+	> 250 pg/mL	-
TMOD1	+	+	1,25 ng/mL	-
UPK3A	+	+	100 pg/mL	+
BIRC5	+	+	200 pg/mL	-
CDH1	+	-	N/A	-
FBLN3	+	+	> 3,12 ng/mL	+
p53	+	+	2,5 ng/mL	-
ErbB2	+	-	N/A	-

+, présence d'une courbe d'étalonnage ou détection de marqueur

-, absence de courbe d'étalonnage ou pas de détection de marqueur

N/A, non applicable

*EN2 n'a pas pu être détecté avec la trousse ELISA mais par un immunoessai en mode direct décrit dans le Chapitre 7 en utilisant une gamme d'étalonnage avec un échantillon urinaire de patient

**Les limites de détection ont été déterminées graphiquement sur les courbes d'étalonnage

1.3. SECONDE ÉVALUATION

Dix marqueurs ont ainsi été présélectionnés lors de la première évaluation : MMP9, EN2, VEGF, EGFR, IL8, DCN, MYC, UPK3A, PTGS2 et FBLN3. Ils ont ensuite subi une seconde étape d'évaluation dans 16 échantillons de patients atteints de cancer de la vessie et 16 échantillons de donneurs sains pour identifier les marqueurs d'intérêt pour le diagnostic du cancer de la vessie.

Les concentrations de marqueurs obtenues sont présentées dans la Figure 8-2. Elles ont été déterminées en utilisant des trousse ELISA, à l'exception du marqueur EN2 dont le dosage est un immunoessai en mode direct (la gamme d'étalonnage étant établie avec un échantillon urinaire de patient, les concentrations obtenues sont données en unités arbitraires). Elles ont ensuite été normalisées par le taux de créatinine urinaire de chaque échantillon. Une valeur seuil a été calculée pour chaque marqueur. Elle correspond à la moyenne des concentrations des échantillons de donneurs sains additionnée de trois fois son écart-type. Cette formule permet d'avoir 99,7% des donneurs sains en-dessous de la valeur seuil.

Parmi les dix marqueurs évalués, huit ont au moins un échantillon de patient positif, c'est-à-dire avec une concentration de marqueur supérieure à la valeur seuil. Pour trois de ces marqueurs (VEGF, DCN et UPK3A), la protéine n'a pas été détectée dans les échantillons de donneurs sains, entraînant une valeur seuil de zéro. Ainsi pour ces trois marqueurs, tout échantillon de patients avec une concentration en marqueur supérieure à zéro est considéré comme positif. Quatre autres marqueurs (MMP9, IL8, MYC et EN2) présentent un échantillon de donneur sain avec une concentration en marqueur supérieure à la valeur seuil. Ces échantillons sont donc considérés comme faux-positifs. Enfin, PTGS2 est le seul marqueur ne présentant aucun échantillon (de donneur sain ou de patient) avec une concentration supérieure à la valeur seuil.

Sélection de biomarqueurs urinaires pour le diagnostic et la récurrence des tumeurs urothéliales

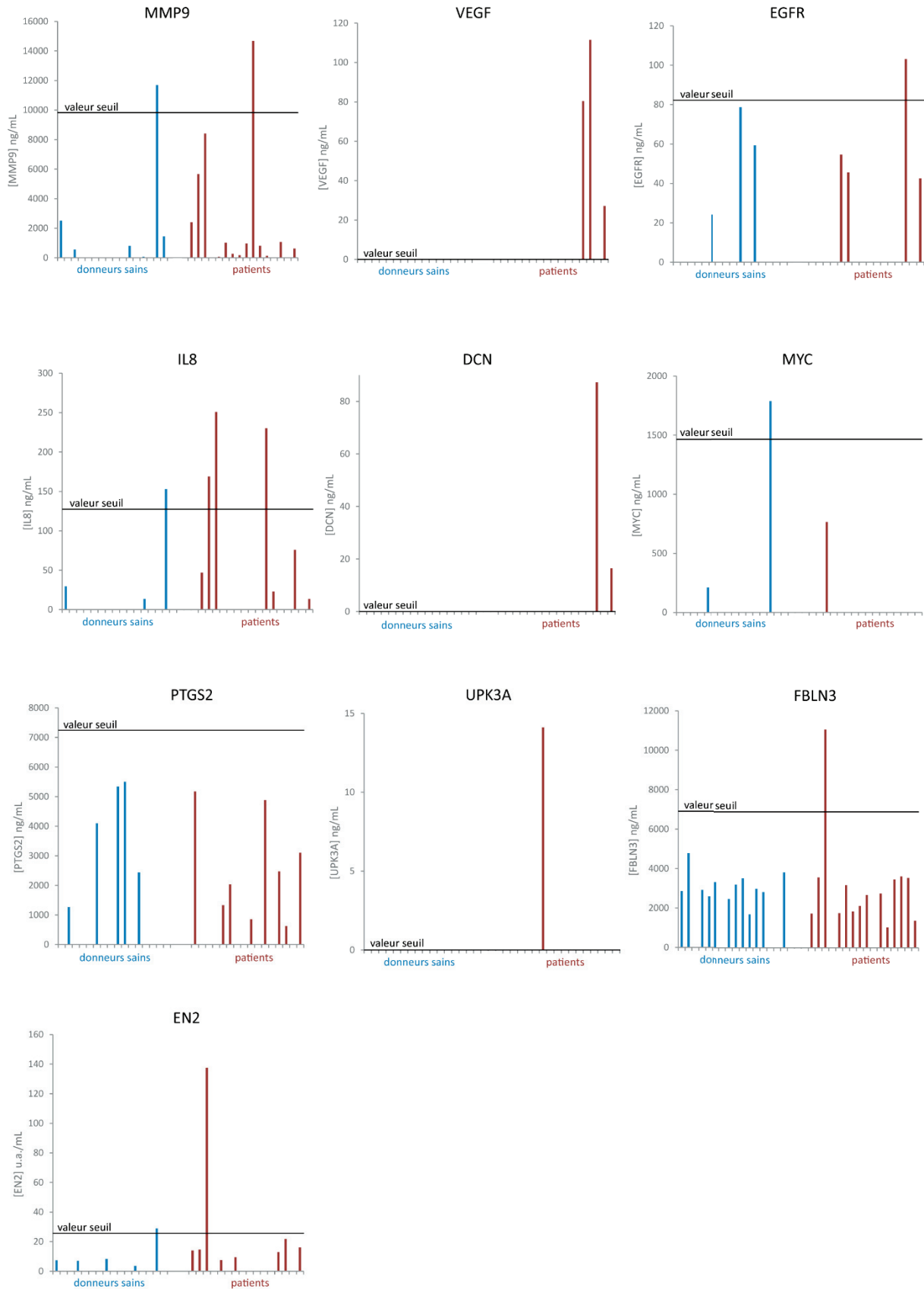


Figure 8-2. Concentrations des marqueurs dans les échantillons de patients atteints de cancer de la vessie et de donneurs sains (normalisées par la créatinine urinaire). u.a., unité arbitraire

Les performances diagnostiques des marqueurs ont ensuite été évaluées par une analyse ROC (fonction d'efficacité du récepteur, *receiver operating characteristic*) grâce au logiciel PanelomiX. L'analyse ROC est une mesure de la performance d'un classificateur, tel qu'un test diagnostique, par l'évaluation des caractéristiques intrinsèques du test (sa sensibilité et sa spécificité). La courbe ROC ainsi obtenue donne une représentation graphique des caractéristiques intrinsèques d'un test pour différents seuils de positivité de celui-ci. Afin de faciliter la comparaison de plusieurs classificateurs, l'aire sous la courbe ROC (AUC) est calculée. C'est une statistique résumée des caractéristiques intrinsèques du test. Sa valeur est comprise entre 0,5 et 1 (ou entre 50 % et 100%) : une valeur d'AUC de 1 signifie que le test est parfaitement discriminant tandis qu'une valeur de 0,5 signifie que le test ne fait pas mieux que le hasard.

Les performances individuelles des marqueurs obtenues par cette méthode sont décrites dans le Tableau 8-2. Les valeurs de sensibilité et de spécificité sont données par le logiciel pour une valeur seuil optimale. MMP9 présente les meilleures caractéristiques intrinsèques avec une AUC de 0,742, une spécificité de 68,8% et une sensibilité de 86,7%. Les marqueurs VEGF et DCN présentent une haute spécificité (100%) car ils ont été détectés uniquement dans des échantillons de patients. Cependant, leur sensibilité est faible (20% pour VEGF et 13,3% pour DCN). Enfin, le marqueur UPK3A n'a pas pu être inclus dans cette analyse car il n'a été détecté que dans un seul échantillon.

Tableau 8-2. Performances individuelles des biomarqueurs classés par valeur d'AUC

Marqueur	% AUC (IC à 95%)	% Sp (IC à 95%)	% Se (IC à 95%)
MMP9	74,2 (56,0-92,3)	68,8 (43,8-87,5)	86,7 (66,7-100,0)
EN2	66,0 (47,8-84,3)	87,5 (68,8-100,0)	53,3 (26,7-80,0)
IL8	65,4 (48,9-81,9)	81,2 (62,5-100,0)	46,7 (20,0-73,3)
VEGF	60,0 (49,5-70,5)	100,0 (100,0-100,0)	20,0 (0,0-40,0)
PTGS2	57,7 (38,7-76,7)	68,8 (43,8-87,5)	53,3 (26,7-80,0)
DCN	56,7 (47,8-65,6)	100,0 (100,0-100,0)	13,3 (0,0-33,3)
EGFR	54,0 (38,5-69,4)	87,5 (68,8-100,0)	26,7 (6,7-46,7)
FBLN3	47,5 (26,1-68,9)	56,2 (31,2-81,2)	60,0 (33,3-86,7)
MYC	47,1 (36,5-57,7)	93,8 (81,2-100,0)	6,7 (0,0-20,0)

AUC, aire sous la courbe ROC ; IC, intervalle de confiance ; Sp, spécificité ; Se, sensibilité

Le logiciel PanelomiX permet également l'évaluation des performances de combinaisons de marqueurs. Les auteurs ont développé un algorithme basé sur les seuils individuels de marqueurs selon la méthode de combinaison itérative de biomarqueurs et de seuils (ICBT, *iterative combination of biomarkers and thresholds*) (Robin *et al*, 2013). Après détermination du panel le plus performant, le logiciel exécute une validation croisée qui permet de tester les performances du panel et la robustesse du modèle. Pour cela, la technique de *k-fold cross-validation* est utilisée : l'ensemble des données, appelé l'échantillon original, est divisé aléatoirement en 10 sous-ensembles (ou échantillons) de taille égale ($k = 10$). Neuf des 10 échantillons ($k-1$) sont utilisés comme l'ensemble d'apprentissage du modèle tandis que l'échantillon restant est utilisé pour la validation du modèle. L'opération est répétée 10 fois, chaque échantillon étant utilisé une fois comme ensemble de validation.

Toutes les combinaisons de marqueurs ont donc été testées par PanelomiX (à l'exception du marqueur UPK3A). La meilleure combinaison en termes de performance inclut six marqueurs : MMP9, VEGF, IL8, PTGS2, FBLN3 et EN2 avec une AUC de 0,871 et de 0,810 après validation croisée (Tableau 8-3). Dans notre contexte clinique, la spécificité est un paramètre primordial du test diagnostique. Nous avons donc décidé de modifier la composition du meilleur panel proposé par PanelomiX pour améliorer sa spécificité. En excluant le marqueur FBLN3 du modèle, la performance globale du panel n'est que légèrement réduite tandis que sa spécificité est considérablement augmentée avec une valeur de 93,8% en apprentissage (alors qu'elle était initialement de 81,2%). Cette meilleure spécificité se fait cependant au détriment de la sensibilité qui diminue à 80% (Tableau 8-3).

Ainsi, en privilégiant la spécificité du test, nous avons défini le panel final (Panel 1) suivant : MMP9, VEGF, IL8, PTGS2 et EN2.

Tableau 8-3. Performances du meilleur panel déterminé par PanelomiX et du panel final

Meilleur panel		% AUC (IC à 95%)	% Sp (IC à 95%)	% Se (IC à 95%)
MMP9 VEGF IL8 PTGS2 FBLN3 EN2	Apprentissage	87,1 (72,3-100,0)	81,2 (62,5-100,0)	93,3 (80,0-100,0)
	Validation croisée	81,0 (64,0-98,1)	68,8 (43,8-93,8)	93,3 (80,0-100,0)
Panel final (Panel 1)		% AUC (95% CI)	% Sp (95% CI)	% Se (95% CI)
MMP9 VEGF IL8 PTGS2 EN2	Apprentissage	86,5 (72,7-100,0)	93,8 (81,2-100,0)	80,0 (60,0-100,0)
	Validation croisée	81,9 (66,3-97,5)	87,5 (68,8-100,0)	73,3 (53,3-93,3)

AUC, aire sous la courbe ROC ; IC, intervalle de confiance ; Sp, spécificité ; Se, sensibilité

1.4. CONCLUSION

Cette première étude a permis la définition d'un panel de biomarqueurs pour le diagnostic du cancer de la vessie grâce à l'évaluation de plusieurs marqueurs candidats dans des échantillons urinaires de patients atteints de cancer de la vessie et de donneurs sains. Ce Panel 1 composé de cinq marqueurs a une performance globale supérieure au marqueur MMP9 qui présentait la meilleure performance individuelle (Figure 8-3). En effet l'AUC du Panel 1 est de 0,865 (avec un intervalle de confiance à 95% (IC à 95%) de 0,727 à 1,0) tandis que le MMP9 a une valeur d'AUC de 0,742 (IC à 95% de 0,560 à 0,923). La sensibilité du Panel 1 est réduite par rapport à MMP9 (80,0% et 86,7% respectivement). Néanmoins, la spécificité, paramètre le plus pertinent dans ce contexte clinique, est considérablement augmentée (93,8% par rapport à 68,8%). Il est important de noter que les intervalles de confiance sont larges du fait de la taille réduite de l'étude (32 échantillons).

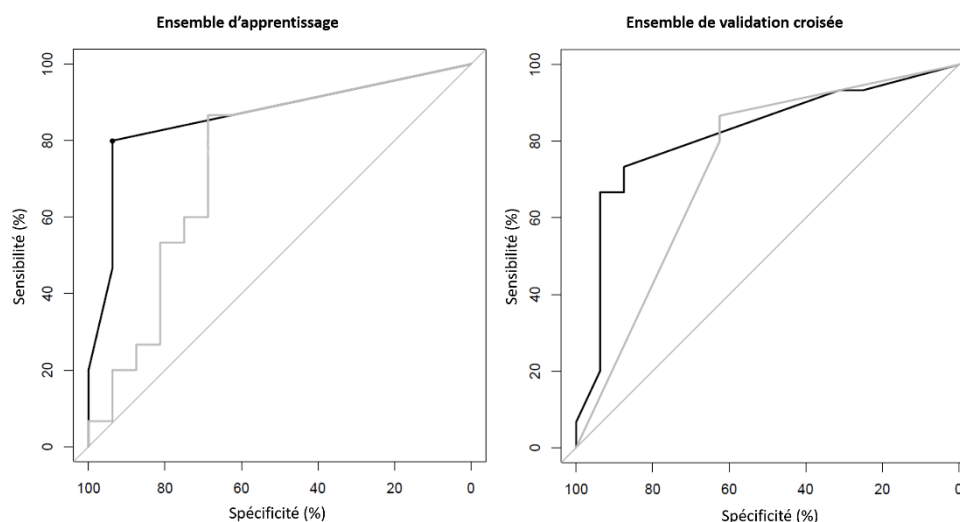


Figure 8-3. Courbes ROC du Panel 1 (en noir) et de MMP9 (en gris) pour l'ensemble d'apprentissage et l'ensemble de validation croisée

Le suivi des patients est primordial dans le cancer de la vessie car 50% à 70% des TVNIM récidivent après un traitement de première intention avec une possible infiltration du muscle. Ainsi, nous avons étudié, en collaboration avec l'entreprise emergentec biodevelopment, le potentiel des marqueurs du Panel 1 pour la prédiction de la progression de la tumeur. Le rôle des marqueurs dans l'invasivité tumorale a donc été évalué grâce au modèle moléculaire défini pour le cancer de la vessie et à une recherche de la littérature scientifique concernant les mécanismes d'action des marqueurs.

Une représentation schématique des voies de développement de l'invasivité a été construite à partir des informations extraites de publications (Figure 8-4). Cinq marqueurs sont mis en avant dans ce schéma : MMP9, VEGF, EGFR, IL8 et PTGS2. Une étude a montré le rôle des métalloprotéases matricielles, dont MMP9, dans l'altération du microenvironnement et la favorisation de l'invasion

tumorale et donc leur association à l'invasivité du cancer de la vessie (Kader *et al*, 2007). De plus, l'activation de MMP9 implique les voies de signalisation EGF/EGFR (Pei *et al*, 2014) ainsi que l'expression d'IL8 (Inoue *et al*, 2000). L'activité angiogénique implique également l'expression de VEGF et de ses récepteurs VEGFR1/2 qui favorise l'invasion et la prolifération tumorales (Donmez *et al*, 2009; Nakanishi *et al*, 2009; Kopparapu *et al*, 2013). Enfin, PTGS2 a aussi un lien avec le développement et l'invasion du cancer de la vessie par son rôle dans l'angiogénèse (Margulis *et al*, 2007; Gee *et al*, 2008).

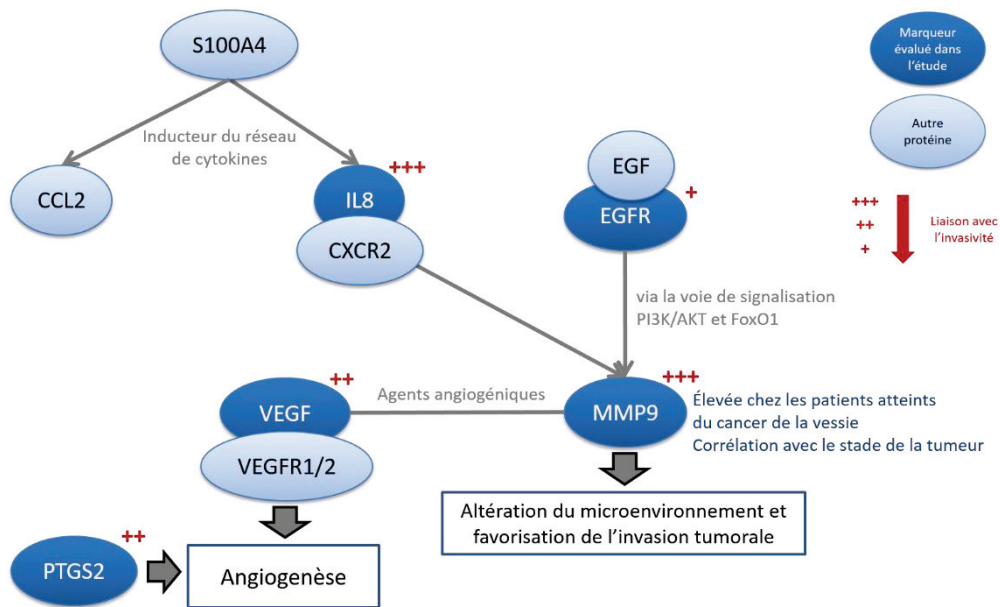


Figure 8-4. Représentation schématique des voies de développement de l'invasivité des tumeurs urothéliales (réalisée en collaboration avec emergentec biodevelopment). CCL2, chemokine ligand 2 ; CXCR2, récepteur de chimiokines CXC 2 ; S100A4, S100 calcium-binding protein A4

Le Panel 1 comprend quatre des marqueurs inclus dans le schéma des voies de développement de l'invasivité des tumeurs urothéliales : MMP9, IL8, VEGF et PTGS2. Le cinquième marqueur, EN2, n'a pas de lien apparent avec l'invasivité mais est un marqueur prometteur pour le cancer de la vessie (Morgan *et al*, 2013). Enfin, EGFR est le seul marqueur présent dans le schéma d'invasivité qui n'est pas inclus dans le Panel 1. Son inclusion n'était pas bénéfique car elle n'augmentait pas les performances globales du panel. Ainsi, le Panel 1 présente un potentiel pour prédire l'invasion tumorale. D'autres études sur de plus grands échantillons sont néanmoins nécessaires pour orienter ce panel vers un outil de prédiction de l'invasion tumorale.

Cette première étude a également permis de mettre en avant les problématiques liées à l'urine. Bien qu'elle soit une source intéressante de biomarqueurs, les échantillons prélevés peuvent montrer une grande variabilité de volume, de concentration protéique (particulièrement en cas d'insuffisance rénale) ou de pH. De nombreux facteurs influencent la composition de l'urine, notamment l'âge, la santé et le régime alimentaire du patient. De plus, des dégradations sont possibles lors de la conservation des échantillons. Les résultats d'études protéomiques peuvent donc différer selon les

méthodes de traitement des échantillons urinaires. C'est pour ces raisons que la standardisation des méthodes serait souhaitable pour ce type d'études. L'INCa a ainsi publié en 2013 des recommandations pour améliorer la standardisations des étapes de recueil, conditionnement et stockage des prélèvements urinaires pour la recherche (Lehmann *et al*, 2009).

Il est également souvent recommandé de normaliser la quantité ou la concentration de protéines en calculant son rapport à la concentration de petites molécules excrétées par le rein telle que la créatinine ou l'albumine (Thomas *et al*, 2010). Ainsi, nous avons choisi de normaliser les concentrations obtenues lors de cette première étude par le taux de créatinine urinaire préalablement mesuré pour chaque échantillon.

Enfin, il est possible de limiter l'interférence de cette matrice lors de dosages par dilution de l'échantillon urinaire (Taylor *et al*, 2012). Notre protocole d'immunoessai inclut donc une première étape de dilution qui permet également de limiter le volume d'échantillon utilisé pour chaque dosage. Cette stratégie a cependant pu entraîner une diminution de la sensibilité des dosages ; il est possible que certains marqueurs dont les concentrations étaient proches de la limite de détection n'aient pas été détectés.

2. SECONDE ÉTUDE

En comparant des échantillons urinaires de patients atteints de cancer de la vessie et des échantillons urinaires de donneurs sains, seul l'aspect de diagnostic primaire du cancer de la vessie a pu être investigué dans l'étude pilote (bien que le potentiel de prédiction d'invasion tumorale ait été également évalué). Suite à cette étude pilote, nous avons défini plus précisément les objectifs de sélection de biomarqueurs dans le cadre du cancer de la vessie. En prenant en compte l'histoire naturelle du cancer de la vessie et le besoin de personnaliser la prise en charge des patients lors de leur suivi, il a été décidé d'orienter cette deuxième étude vers les risques de récurrence (et éventuellement) d'invasion des tumeurs urothéliales en évaluant les échantillons urinaires de patients présentant une récurrence de cancer de la vessie et de patients suivis mais ne présentant pas de récurrence.

Un total de dix-neuf marqueurs a été évalué dans cette seconde étude. Le choix des marqueurs à évaluer était basé sur plusieurs facteurs : les tests disponibles chez les partenaires du projet, les résultats de l'étude précédente (les cinq marqueurs du Panel 1 sont inclus dans l'étude) et le lien des marqueurs avec la récurrence du cancer de la vessie.

2.1. CONCEPTION DE L'ÉTUDE

Les étapes de l'étude sont décrites dans la Figure 8-5. L'étude inclut deux groupes de patients atteints du cancer de la vessie : des patients présentant une récurrence et des patients ne présentant pas de récurrence. Les dix-neuf marqueurs ont été mesurés dans les échantillons urinaires de ces patients grâce à deux plateformes différentes : nous avons évalué douze marqueurs avec des trousse ELISA et de façon automatisée (de façon similaire à l'étude pilote) et nos partenaires de l'Austrian Institute of Technology (AIT) ont évalué dix marqueurs grâce à une puce à protéines développée dans leur laboratoire (Gogalic *et al*, 2015). Une analyse statistique multivariée a ensuite été effectuée, incluant les résultats des deux plateformes et les paramètres cliniques des patients et aboutissant à la sélection d'un panel de marqueurs et de paramètres cliniques pour le diagnostic de la récurrence du cancer de la vessie.

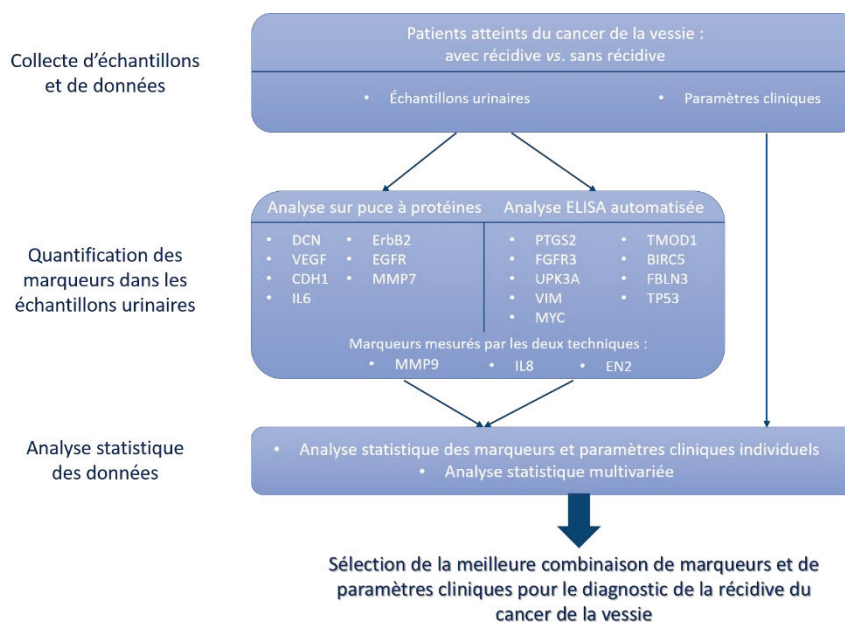


Figure 8-5. Conception de la seconde étude de sélection de marqueurs

2.1.1. PROCESSUS DE SÉLECTION DES PATIENTS

L'étude comportait initialement 80 échantillons de patients (40 échantillons dans chaque groupe). Les critères initiaux d'inclusion étaient les suivants : le patient a été diagnostiqué avec un cancer de la vessie (par cystoscopie et examen histopathologique), le patient a été traité avant la collecte de l'échantillon et le patient n'a pas d'antécédents de TVIM. L'échantillon a donc été recueilli lors d'une visite de suivi. D'autres paramètres cliniques ont été recueillis lors de cette visite. L'ensemble des paramètres cliniques évalués pendant l'étude sont donc : sexe, âge au moment du diagnostic, âge au moment de la collecte de l'échantillon, nombre de mois entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon, nombre de thérapies par BCG entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon, nombre de thérapies par mitomycine entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon ainsi que le nombre de RTUV entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon.

Avant l'analyse statistique, une seconde sélection plus rigoureuse des patients a été réalisée. Un historique complet du patient devait donc être disponible (pas de paramètre clinique manquant). Sur la base de ce critère additionnel, 48 des 80 patients initiaux ont été inclus. De plus, il était nécessaire que les marqueurs inclus dans l'analyse statistique aient des mesures valides pour tous les échantillons. Ainsi, trois autres patients ont été exclus au cours de cette sélection. La cohorte finale était donc constituée de 45 patients : 27 patients ne présentant pas de récidive et 18 patients présentant une récidive.

2.1.2. ANALYSE DES RÉSULTATS

L'analyse statistique des données a été effectuée par emergentec biodevelopment. Concernant l'analyse multivariée, des modèles de régression linéaire multiple ont été construits selon deux stratégies : une sélection manuelle basée sur l'association de paramètres individuels et une sélection automatique utilisant la méthode LASSO (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) pour déterminer la probabilité de sélection des paramètres individuels. Les performances et la robustesse des modèles sont évaluées par validation croisée selon la technique *leave-one-out cross-validation* (LOOCV).

2.2. DOSAGE DES MARQUEURS

Douze des dix-neuf marqueurs ont été évalués par notre plateforme automatisée utilisant des trousse ELISA. Les résultats sont résumés dans le Tableau 8-4. Aucun résultat n'a été obtenu pour UPK3A car son analyse complète n'a pas pu être effectuée en raison d'une difficulté technique (la plaque 96-puits a été endommagée par l'automate de pipetage au cours de l'analyse). Des courbes d'étalonnage dans l'urine ont pu être obtenues pour tous les autres marqueurs, à l'exception de FBLN3. Les concentrations de ce dernier ont donc été déterminées grâce à la courbe d'étalonnage dans le diluant. Trois des onze dosages valides n'ont pas détecté leur cible dans les échantillons urinaires (VIM, MYC et p53).

Tableau 8-4. Dosages des biomarqueurs de la seconde étude

Marqueur	Gamme d'étalonnage dans le diluant	Gamme d'étalonnage dans l'urine	Limites de détection** (urine)	Détection du marqueur dans les échantillons
PTGS2	-	+	5 ng/mL	+
FGFR3	+	+	1000 pg/mL	+
UPK3A	-	-	N/A	N/A
VIM	+	+	112,5 ng/mL	-
MYC	+	+	1,25 ng/mL	-
TMOD1	+	+	2,5 ng/mL	+
BIRC5	+	+	1000 pg/mL	+
FBLN3	+	-	25 ng/mL (diluant)	+
p53	+	+	10 ng/mL	-
MMP9	+	+	666,7 pg/mL	+
IL8	+	+	125 pg/mL	+
EN2	+	+	1,25 ng/mL	+

+, présence d'une courbe d'étalonnage ou détection de marqueur ; -, absence de courbe d'étalonnage ou pas de détection de marqueur ; N/A, non applicable

**Les limites de détection ont été déterminées graphiquement sur les courbes d'étalonnage

Selon le processus de sélection des patients et afin d'éviter les artefacts causés par des valeurs manquantes, seuls trois des marqueurs ont été sélectionnés pour l'analyse statistique (IL8, MMP9 et FBLN3). En effet, du fait du volume limité disponible pour chaque échantillon, de nombreux marqueurs n'ont pas pu être analysés dans la totalité des échantillons. Les autres marqueurs inclus dans l'analyse statistique sont ceux évalués par la puce à protéines d'AIT. Ainsi, treize des dix-neuf marqueurs initiaux ont pu être inclus dans l'analyse statistique.

Deux marqueurs (IL8 et MMP9) ont été mesurés par les deux plateformes pour permettre d'évaluer la corrélation entre les deux techniques d'analyse. Des corrélations significativement positives ont été observées pour les deux marqueurs avec un coefficient de corrélation de Pearson de 0,83 pour IL8 et de 0,70 pour MMP9.

2.3. ÉVALUATION DES PERFORMANCES

L'évaluation des performances s'est effectuée en deux étapes : les paramètres ont tout d'abord été évalués individuellement puis de façon combinée.

2.3.1. ÉVALUATION DES PERFORMANCES INDIVIDUELLES

Afin d'évaluer le potentiel des paramètres individuels (paramètres cliniques et biomarqueurs) pour la détection de la récurrence du cancer de la vessie, une comparaison des deux groupes a été effectuée (test statistique z) et les performances évaluées par une analyse ROC. Les résultats sont résumés dans le Tableau 8-5.

Concernant les paramètres cliniques, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes. Cependant, les paramètres *nb.récurrences.antérieures*, *thérapie.BCG* et *nb.RTUV.antérieures* présentent les meilleures AUC et possèdent donc un potentiel pour la détection de récurrence du cancer de la vessie. Quant aux biomarqueurs, aucun candidat ne présente une performance adéquate pour un test de diagnostic de la récurrence. Le marqueur ErbB2 a la meilleure performance avec une valeur d'AUC de 0,73. Quatre marqueurs présentent une valeur d'AUC inférieure à 0,5 (IL6_{puce}, MMP7_{puce}, IL8_{PA} et MMP9_{PA}). Les autres marqueurs ont une valeur d'AUC entre 0,52 à 0,69.

Le manque de performance des paramètres individuels souligne donc le besoin d'associer plusieurs paramètres pour atteindre une performance acceptable pour un test diagnostique. Les marqueurs les plus prometteurs (VEGF_{puce}, IL8_{puce}, EN2_{puce} et ErbB2_{puce}) ont donc été sélectionnés pour l'analyse multivariée.

Tableau 8-5. Performances individuelles des paramètres

Paramètre clinique	Pr(> z)	AUC	Marqueur	Pr(> z)	AUC
<i>échantillon-diagnostic</i>	0,42	0,50	DCN _{puce}	0,67	0,57
<i>sexe</i>	0,89	0,51	VEGF _{puce} *	0,05	0,67
<i>âge.diagnostic</i>	0,70	0,48	IL8 _{puce} *	0,08	0,69
<i>âge.échantillon</i>	0,45	0,57	CDH1 _{puce}	0,66	0,53
<i>grade.diagnostic (G2/G3)</i>	0,32 / 0,48	0,57	IL6 _{puce}	0,65	0,48
<i>stade.diagnostic</i>	0,52	0,55	EN2 _{puce} *	0,09	0,65
<i>nb.récidives.antérieures*</i>	0,08	0,63	EGFR _{puce}	0,86	0,53
<i>thérapie.BCG*</i>	0,10	0,65	ErbB2 _{puce} *	0,06	0,73
<i>thérapie.mitomycine</i>	0,49	0,54	MMP7 _{puce}	0,90	0,50
<i>nb.RTUV.antérieures*</i>	0,33	0,58	MMP9 _{puce}	0,72	0,58
			IL8 _{PA}	0,74	0,47
			MMP9 _{PA}	0,46	0,50
			FBLN3 _{PA}	0,54	0,52

*Paramètres cliniques et marqueurs présentant la meilleure AUC individuelle

Les marqueurs se terminant par *puce* ont été mesurés avec la puce à protéines. Les marqueurs se terminant par *PA* ont été mesurés par la plateforme automatisée.

échantillon-diagnostic, nombre de mois entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon; *âge.diagnostic*, âge au moment du diagnostic; *âge.échantillon*, âge au moment de la collecte de l'échantillon; *grade.diagnostic*, grade de la tumeur au moment du diagnostic; *stade.diagnostic*, stade de la tumeur au moment du diagnostic; *nb.récidives.antérieures*, nombre de récurrences entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon; *thérapie.BCG*, nombre de thérapies par BCG entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon; *thérapie.mitomycine*, nombre de thérapies par mitomycine entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon; *nb.RTUV.antérieures*, nombre de RTUV entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon

2.3.2. ÉVALUATION DES PERFORMANCES DES PARAMÈTRES EN COMBINAISON

Diverses combinaisons des deux types de paramètres (paramètres cliniques et biomarqueurs) ont été évaluées pour définir un panel multiparamétrique. Six modèles de régression linéaire multiple ont été construits. Le Tableau 8-6 donne leur description et leurs performances.

Tableau 8-6. Performances des modèles de régression linéaire multiple

Modèle	Stratégie	Description	Paramètres inclus	AUC	AUC (LOOCV)
Modèle 1	Sélection manuelle	Comprend les paramètres cliniques présentant au niveau individuel un potentiel pour la détection de la récurrence ainsi que le paramètre âge au moment de la collecte de l'échantillon	<i>nb.récidives.antérieures</i> , <i>thérapie.BCG</i> , <i>nb.RTUV.antérieures</i> , <i>âge.échantillon</i>	0,78	0,65
Modèle 2	Sélection automatique	Comprend les paramètres cliniques avec une probabilité de sélection supérieure à 50%	<i>nb.récidives.antérieures</i> , <i>thérapie.BCG</i> , <i>stade.diagnostic</i>	0,80	0,72
Modèle 3	Sélection manuelle	Comprend les marqueurs présentant au niveau individuel un potentiel pour la détection de la récurrence	VEGF _{puce} , IL8 _{puce} , EN2 _{puce} , ErbB2 _{puce}	0,72	0,51
Modèle 4*	Sélection automatique	Comprend les marqueurs avec une probabilité de sélection supérieure à 50%	CDH1 _{puce} , IL8 _{puce} , ErbB2 _{puce} , IL6 _{puce} , EN2 _{puce} , VEGF _{puce}	0,78	0,61
Modèle 5	Combinaison des paramètres du Modèle 1 et du Modèle 3			0,82	0,64
Modèle 6	Combinaison des paramètres du Modèle 2 et du Modèle 4			0,91	0,70

LOOCV, *leave-one-out cross-validation* (validation croisée)

âge.échantillon, âge au moment de la collecte de l'échantillon; *stade.diagnostic*, stade de la tumeur au moment du diagnostic; *nb.récidives.antérieures*, nombre de récurrences entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon; *thérapie.BCG*, nombre de thérapies par BCG entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon; *nb.RTUV.antérieures*, nombre de RTUV entre le premier diagnostic et la collecte de l'échantillon

Les modèles construits de façon automatique montrent une performance globale supérieure à celle des modèles construits manuellement. Concernant les modèles de paramètres cliniques, le modèle déterminé automatiquement (Modèle 2) comprend un paramètre en moins mais est tout de même plus performant que le modèle construit manuellement (Modèle 1). La diminution de l'AUC du Modèle 1 après validation croisée peut être en partie due à la forte corrélation des deux variables *nb.récidives.antérieures* et *nb.RTUV.antérieures* (la RTUV est le traitement de première intention des tumeurs urothéliales).

Quant aux modèles comprenant les marqueurs, sachant que le Modèle 4 inclut un plus grand nombre de marqueurs que le Modèle 3, il n'est pas surprenant qu'il présente de meilleures performances. De

plus, le Modèle 4 présente également une meilleure performance après validation croisée et semble donc être plus adapté pour un test de diagnostic de la récurrence du cancer de la vessie.

De la même manière, le Modèle 6 qui comprend les paramètres sélectionnés automatiquement (des Modèles 2 et 4) est plus performant que son homologue en sélection manuelle (Modèle 5). Une fois de plus, le Modèle 6 possédant un paramètre en plus que le Modèle 5, sa valeur d'AUC supérieure était attendue (0,91 pour le Modèle 6 et 0,82 pour le Modèle 5). Il en est de même pour les performances après validation croisée (0,70 pour le Modèle 6 et 0,64 pour le Modèle 5). En considérant tous les modèles évalués, le Modèle 6 est le plus performant en termes d'AUC.

2.4. CONCLUSION

Cette deuxième étude a évalué le potentiel de plusieurs marqueurs et paramètres cliniques pour le diagnostic de la récurrence du cancer de la vessie. L'évaluation des performances des paramètres cliniques individuels a montré que ceux-ci n'étaient pas suffisants pour un tel test diagnostique. De plus, aucun marqueur n'a pu atteindre individuellement une performance acceptable. En associant plusieurs de ces deux types de marqueurs, des modèles de régression multiple ont été identifiés. Le plus performant de ces modèles, le Modèle 6, atteint une valeur d'AUC de 0,91, montrant une meilleure performance que les paramètres individuels. Il s'agit d'un modèle à sélection automatique comprenant les paramètres suivants : le nombre de récurrences antérieures, le nombre de thérapies par BCG, le stade de la tumeur au moment du diagnostic, CDH1, IL8, ErbB2, IL6, EN2 et VEGF.

Les paramètres cliniques sélectionnés manuellement (Modèle 1) sont également inclus dans le Modèle 6, à l'exception de deux paramètres : l'âge au moment de la collecte de l'échantillon et le nombre de RTUV antérieures. La sélection manuelle du paramètre âge au moment de la collecte de l'échantillon était basée sur sa pertinence clinique présumée et non sur ses résultats statistiques. Quant au nombre de RTUV antérieures, il est fortement corrélé au nombre de récurrences antérieures, il n'est donc pas intéressant de le sélectionner dans un panel final.

Les marqueurs d'intérêt identifiés dans l'analyse des performances individuelles (IL8, ErbB2, EN2 et VEGF) sont tous inclus dans le Modèle 6. L'analyse multivariée a fourni deux marqueurs supplémentaires : IL6 et CDH1. Une recherche de la littérature scientifique sur ces six marqueurs a mis en avant plusieurs études montrant leur lien avec la récurrence des tumeurs urothéliales. En effet, une étude évaluant la protéine CDH1 dans des échantillons tissulaires de TVNIM a mis en évidence la prédiction possible des récurrences tumorales par la localisation cytoplasmique de CDH1 (Gallagher *et al*, 2008). Mahnken *et al*. ont également trouvé une corrélation entre la détection anormale de CDH1 par immunohistochimie et la récurrence de tumeurs urothéliales, identifiant ce paramètre comme un facteur

prédictif indépendant de survie sans récurrence (Mahnken *et al*, 2005). Une relation entre les niveaux d'expression élevés d'IL8 dans les tissus malins et la récurrence tumorale a également été trouvée (Reis *et al*, 2012). Des résultats similaires ont été décrits pour l'IL6 (Chen *et al*, 2013a). De plus, un panel de cytokines, incluant IL8 et IL6, a montré un potentiel dans l'identification du risque de récurrence tumorale chez des patients sous traitement par BCG (Kamat *et al*, 2016). Plusieurs études ont démontré un lien entre VEGF et la récurrence du cancer de la vessie, au niveau de l'ARN messager mais également au niveau protéique (Crew *et al*, 1997; Crew, 1999; Koppurapu *et al*, 2013). Concernant ErbB2, sa surexpression a été associée aux TVNIM et aux risques de récurrence et de progression mais certaines études ont montré des résultats variables (Gardiner *et al*, 1992; Underwood *et al*, 1995; Krüger *et al*, 2002; Chen *et al*, 2013b). ErbB2 n'est donc pas clairement établi comme marqueur pour la récurrence de tumeurs urothéliales. Enfin, EN2 a été étudié comme marqueur urinaire potentiel pour le diagnostic du cancer de la vessie mais sa sécrétion par les TVNIM récurrentes a également été démontrée (Morgan *et al*, 2013).

Bien que les liens avec la récurrence ou son mécanisme ne soient pas encore clairement établis pour tous les biomarqueurs sélectionnés, ils montrent tous un rôle potentiel pour révéler la récurrence du cancer de la vessie. La combinaison de ces marqueurs avec des paramètres cliniques semble être une stratégie adéquate pour atteindre des performances acceptables pour le diagnostic de la récurrence du cancer de la vessie. Un tel panel pourrait permettre la détermination de profils spécifiques à chaque patient et pourrait améliorer la stratification du risque de récurrence.

Cependant, notre étude présente certaines limites, notamment en termes de taille. Le nombre total d'échantillons de patients inclus dans l'analyse statistique a été réduit par notre méthode de sélection. De plus, seul l'aspect diagnostique de récurrence a été évalué ; les informations obtenues au cours de l'étude n'ont pas permis d'évaluer l'aspect pronostique de récurrence. De même, l'invasivité tumorale, sujet développé en fin d'élaboration du Panel 1, n'a pas pu être évaluée lors de la seconde étude.

Cette étude a permis la définition du Panel 2. À présent, il est nécessaire d'effectuer sa validation clinique par une plus grande étude indépendante, permettant la confirmation des résultats et pouvant aboutir à la création d'un outil d'estimation du risque de récurrence par un nouveau concept de stratification des patients.

Suite à l'étape de sélection des biomarqueurs, un test multiparamétrique sur une plateforme automatisée a été développé, d'abord pour le Panel 1 puis pour le Panel 2. Ce développement fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 9. Développement d'une plateforme
d'immunoessais pour la quantification de
biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie

1. INTRODUCTION

L'objectif final du projet DIPROMON est d'établir un concept de stratification de patients atteints de cancer de la vessie notamment par leurs profils de biomarqueurs urinaires. Pour cela, nous avons développé un test multiparamétrique pour la quantification des biomarqueurs sélectionnés. La plateforme développée grâce à l'expertise d'AXO Science présente les caractéristiques suivantes : elle est automatisée, à haut-débit et sous un format de plaques de microtitration 96-puits. C'est une puce à protéines analytique en format d'immunoessai de type sandwich.

1.1. PREUVE DE CONCEPT

Pour démontrer la faisabilité d'une telle plateforme, le dosage quantitatif de trois interleukines recombinantes a été réalisé. Les matrices de plots en fond de puits contenaient donc, en plus des témoins positifs et négatifs et de la BSA, des anticorps de capture pour l'IL6, IL10 et l'IL8. Le test a été réalisé selon le protocole décrit dans le Chapitre 7 (2.2) avec notamment une solution d'anticorps de capture contenant les anticorps biotinylés dirigés contre l'IL6, l'IL10 et l'IL8.

Des gammes d'étalonnages ont été établies dans un diluant (LowCross- Buffer®) puis dans la matrice d'intérêt : l'urine humaine (Figure 9-1). Les intensités obtenues pour les gammes de concentrations des trois interleukines dans le diluant et dans l'urine humaine donnent une courbe d'allure sigmoïde dont le plateau n'est pas visible dans la gamme de concentrations de protéines utilisée. Il est donc possible d'effectuer des gammes d'interleukines en utilisant l'urine humaine comme matrice biologique et les résultats sont similaires à ceux obtenus avec le LowCross-Buffer®. Il existe cependant une différence de sensibilité selon la matrice utilisée. S'agissant d'un test dont les paramètres ne sont pas optimisés, la sensibilité de l'immunoessai dans l'urine peut être améliorée grâce à des étapes d'optimisation.

Par la suite et sauf indication contraire, le développement se fera uniquement en utilisant l'urine humaine. De façon générale, lors du développement de dosages de plusieurs protéines, chaque puits analysé contient tous les anticorps de capture (matrice de plots) et est mis en contact avec tous les anticorps de détection mais seulement une seule protéine. Plusieurs protéines sont analysées dans un même puits lors de tests spécifiques de la réaction croisée.

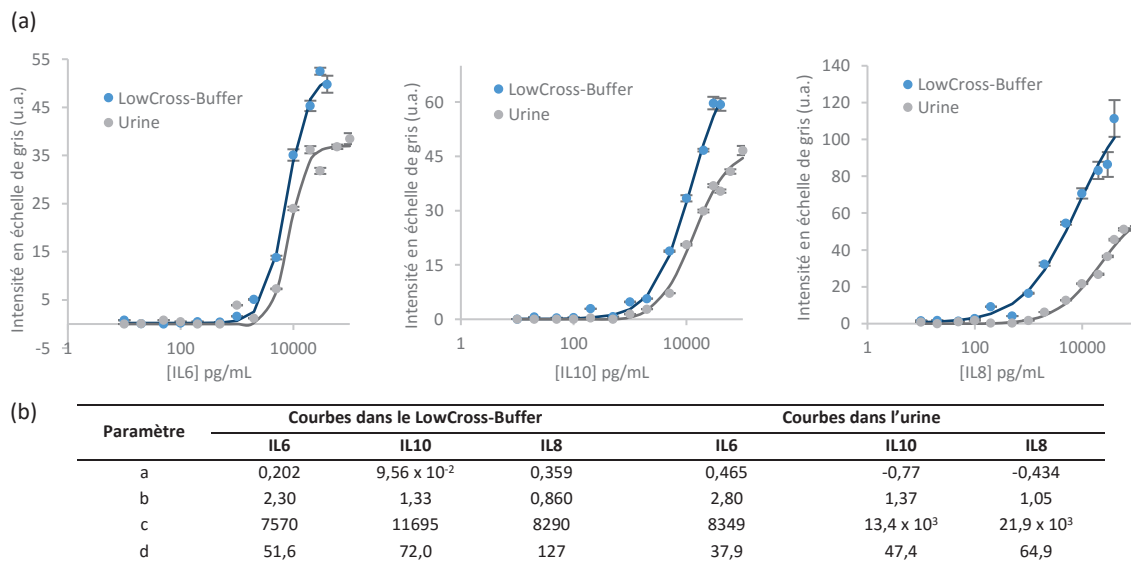


Figure 9-1. Preuve de concept. (a) Courbes d'étalonnage de l'IL6, l'IL10 et l'IL8 (b) Paramètres des courbes ajustées. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 8 plots. u.a., unité arbitraire

1.2. VUE D'ENSEMBLE DU DÉVELOPPEMENT DES IMMUNOESSAIS MULTIPARAMÉTRIQUES

La Figure 9-2 donne une vue d'ensemble du développement des immunoessais multiparamétriques. Celui-ci s'est fait en parallèle avec la sélection des biomarqueurs et la définition des panels. C'est pour cette raison que certains marqueurs ne faisant pas partie du Panel 1 ou du Panel 2 sont tout de même inclus dans l'immunoessai. La Figure 9-2 montre également une modification de support effectuée lors du développement. Les différentes étapes du développement sont détaillées dans les sections suivantes.

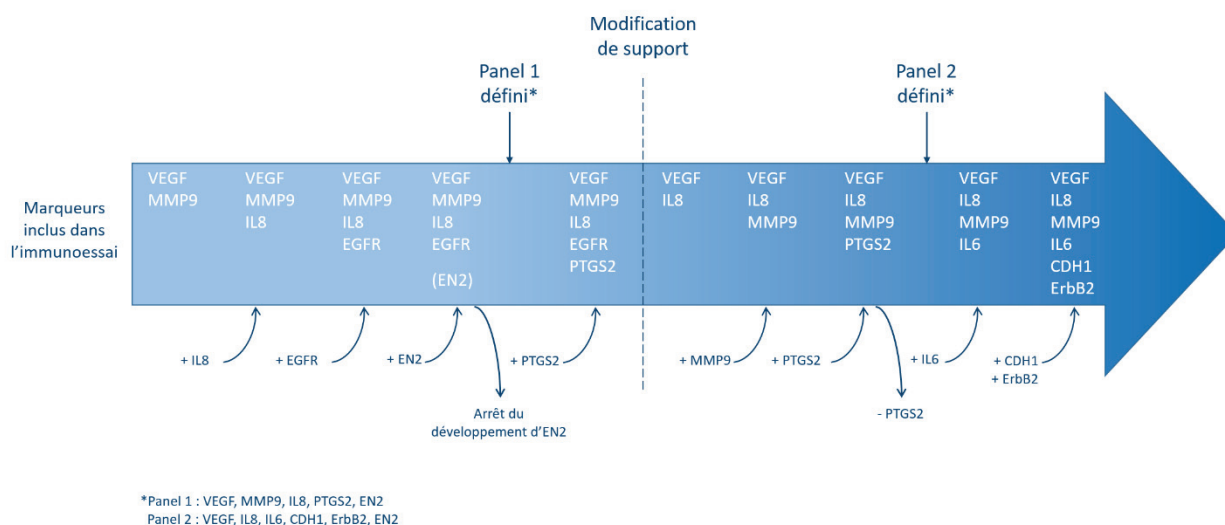


Figure 9-2. Vue d'ensemble du développement des immunoessais multiparamétriques

2. DÉVELOPPEMENT DU PANEL 1

Le développement de l'immunoessai multiparamétrique a débuté avec les marqueurs VEGF, MMP9 et IL8 puis le marqueur EGFR a été ajouté au test. Le Panel 1 a ensuite été défini suite à l'étude pilote. Il comprend les marqueurs suivants : VEGF, MMP9, IL8, PTGS2 et EN2. Ainsi, le développement de l'immunoessai s'est poursuivi par l'intégration des marqueurs PTGS2 et EN2.

2.1. IMMUNOESSAI MULTIPARAMÉTRIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE VEGF, MMP9 ET IL8

La Figure 9-3 décrit les résultats principaux de la conception du test multiparamétrique contenant les marqueurs VEGF, MMP9 et IL8. Il a été possible d'obtenir une courbe d'étalonnage pour les trois protéines (Figure 9-3, a). Afin de déterminer la concentration optimale d'anticorps de détection, une gamme est réalisée pour chacun des anticorps en présence d'une concentration de protéine fixe. Un exemple de détermination de concentration d'anticorps de détection est détaillé plus bas pour EGFR.

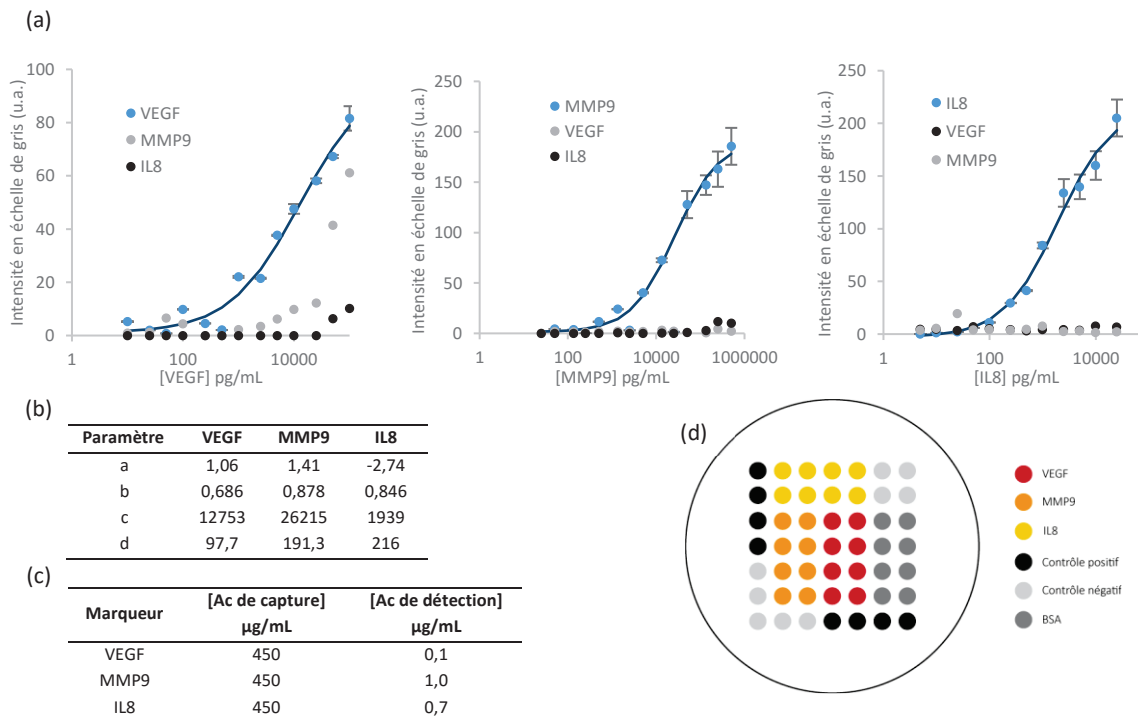


Figure 9-3. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9 et IL8. (a) Courbes d'étalonnage (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai (d) Matrice de plots. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 8 plots. Ac, anticorps

2.1.1. RÉACTION CROISÉE

Les courbes présentées ci-dessus permettent d'évaluer certains types de réaction croisée. En effet, chaque puits de la plaque analysée correspond à une concentration en protéine : le puits est donc en

contact avec une seule protéine. Il contient cependant tous les anticorps de capture (Figure 9-3, d) et a été mis en contact avec tous les anticorps de détection. Il est donc possible de détecter une grande majorité des réactions croisées, notamment la liaison non spécifique d'antigènes aux anticorps. Cette configuration ne permet cependant pas d'évaluer les réactions croisées entre protéines.

Concernant VEGF, on remarque la présence d'un signal au niveau des plots d'anticorps de capture des marqueurs MMP9 et IL8. Cette intensité est assez faible pour IL8 et ne concerne que les deux concentrations les plus élevées de VEGF. Pour MMP9, l'intensité est élevée et augmente lorsque la concentration en VEGF augmente. Il est donc probable que la protéine VEGF interagisse avec les anticorps de capture anti-MMP9. Un phénomène similaire est également possible avec les anticorps de capture anti-IL8 mais l'intensité de signal de ces plots est très faible.

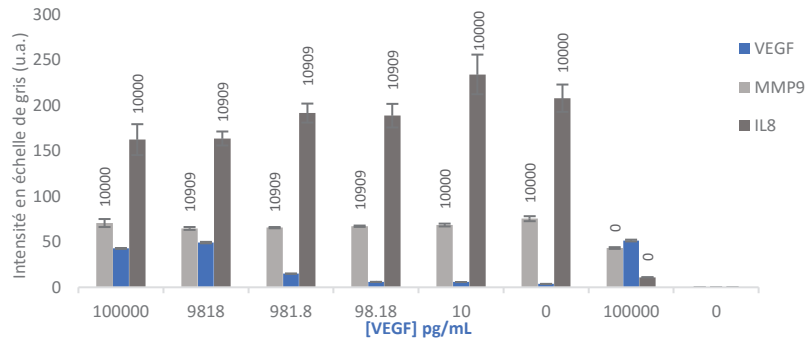
La réaction croisée de ce test multiparamétrique a été réévaluée en analysant le signal donné par plusieurs protéines dans un même puits (Figure 9-4). Cette évaluation se divise en trois parties : pour chaque partie, une gamme de concentrations d'une des trois protéines est réalisée (axe horizontal des histogrammes de la Figure 9-4) tandis que les deux autres protéines sont présentes à une concentration constante (valeurs affichées sur les barres de l'histogramme). Pour pouvoir établir une comparaison, une forte concentration de chaque protéine a également été évaluée en absence des deux autres protéines.

L'interaction de VEGF avec les anticorps de capture anti-MMP9 et anti-IL8 est confirmée par la présence de signal sur ces deux types de plots lorsque la protéine VEGF est seule et à forte concentration (histogramme a) ainsi que par la présence d'un signal sur les plots des anticorps de capture anti-MMP9 alors que seules les protéines VEGF et IL8 sont présentes à une concentration moyenne (histogramme b). Il n'y a cependant aucun signal non spécifique sur les plots des anticorps de capture anti-IL8 lorsque seules les protéines VEGF et MMP9 sont présentes à une concentration moyenne (histogramme c). Ce signal non spécifique n'est donc présent qu'à des fortes concentrations de VEGF.

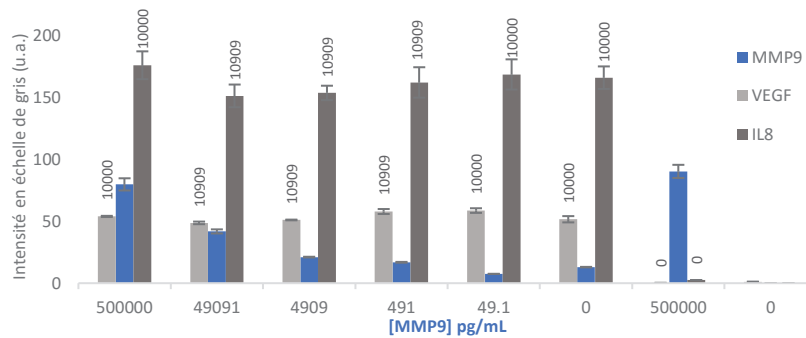
Il est intéressant de noter que pour une même concentration élevée d'IL8, l'intensité du signal diffère selon la présence ou l'absence des deux autres protéines. En effet, une augmentation d'environ 35% du signal est observée lorsque IL8 est en présence de VEGF et MMP9, par rapport au signal lorsque IL8 est seule (histogramme c). Ce signal non spécifique peut être lié à l'interaction non spécifique de VEGF avec les anticorps de capture anti-IL8. Pour une concentration moyenne de VEGF, cette interaction n'est pas ou peu visible à des concentrations faibles voire nulles d'IL8 mais est mis en avant en présence de fortes concentrations d'IL8.

Développement d'une plateforme d'immunoessais pour la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie

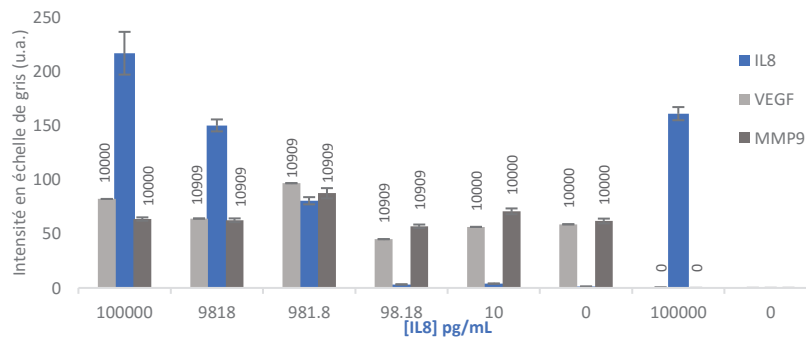
(a) Détection de VEGF (contaminants : MMP9 et IL8)



(b) Détection de MMP9 (contaminants : VEGF et IL8)



(c) Détection d'IL8 (contaminants : VEGF et MMP9)



(d) Marqueur	[Ac de capture] $\mu\text{g/mL}$	[Ac de détection] $\mu\text{g/mL}$
VEGF	450	0,1
MMP9	450	1,0
IL8	450	0,7

Figure 9-4. Évaluation de la réaction croisée de VEGF, MMP9 et IL8 (a, b et c). (d) Conditions de l'immunoessai
 Les valeurs affichées sur les barres correspondent aux concentrations des contaminants en pg/mL.
 Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 8 plots.

2.1.2. AMÉLIORATION DES PERFORMANCES

Le temps d'incubation des protéines et des anticorps de détection est un des paramètres pouvant impacter la sensibilité des dosages. En effet, la durée d'incubation optimale permet l'obtention de l'équilibre de la réaction. L'immunoessai multiparamétrique avait initialement un temps d'incubation d'une heure, il a ensuite été augmenté à deux heures. La Figure 9-5 compare les courbes d'étalonnage obtenues avec ces deux temps d'incubation différents. Lorsque le temps d'incubation est plus long, la

sensibilité du dosage est augmentée grâce à l'augmentation du temps de contact entre les sondes et les cibles. De plus, les limites de détection semblent plus basses. L'intensité maximale du signal est également fortement augmentée pour MMP9 : sa valeur est presque triplée pour un temps d'incubation de deux heures.

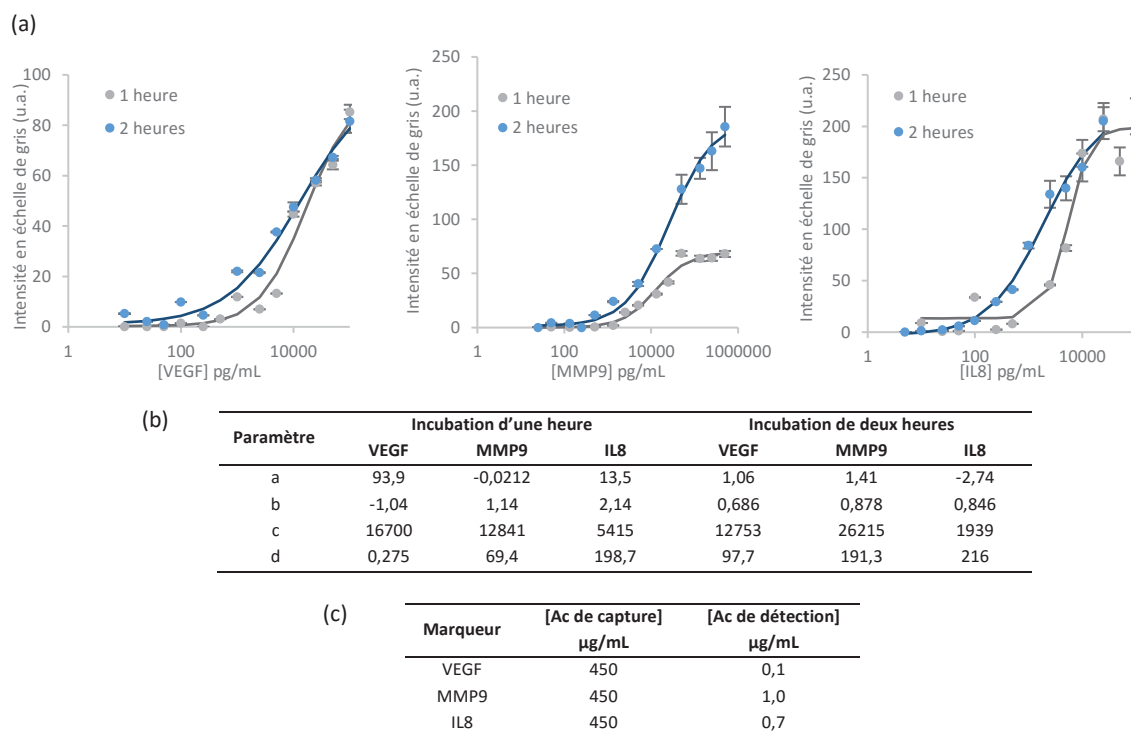


Figure 9-5. Influence du temps d'incubation des protéines et anticorps de détection sur la sensibilité des dosages. (a) Courbes d'étalonnages de VEGF, MMP9 et IL8 selon le temps d'incubation (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 8 plots.

2.2. INTÉGRATION DU MARQUEUR EGFR

Le développement s'est poursuivi par l'intégration d'un nouveau marqueur au test multiparamétrique : EGFR. Ce dernier n'était pas inclus dans le Panel 1 final mais la définition du Panel 1 n'était pas connue au moment de l'intégration d'EGFR. Il a donc été choisi selon les résultats préliminaires de l'étude pilote pour la sélection des biomarqueurs.

Comme pour les trois premiers marqueurs, la réalisation d'une gamme d'étalonnage de la protéine EGFR permet d'obtenir une courbe d'allure sigmoïde (Figure 9-6, a). Une réaction croisée est possible entre EGFR et les anticorps de capture anti-VEGF, mise en évidence par la présence d'un signal sur les plots de ces derniers. Cependant, le signal reste faible et uniquement détectable aux fortes concentrations d'EGFR.

De façon similaire aux marqueurs précédents, la concentration en anticorps de détection a été optimisée grâce à la réalisation d'une gamme de concentration de ce dernier à une concentration fixe

Développement d'une plateforme d'immunoessais pour la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie

d'EGFR (Figure 9-6, d). On remarque alors que l'intensité de signal n'est pas maximale aux plus fortes concentrations d'anticorps (2 et 1 µg/mL) mais augmente jusqu'à 0,7 µg/mL pour diminuer ensuite. Il y a donc un effet « écran » : à de fortes concentrations, l'anticorps polyclonal se trouve en excès et interagit avec plusieurs épitopes de son antigène, empêchant ce dernier d'interagir avec l'anticorps de capture. La concentration optimale d'anticorps de détection a donc été définie à 0,5 µg/mL. Une comparaison des résultats avec la concentration précédente de 0,2 µg/mL (Figure 9-6, b) montre une augmentation de l'intensité du signal sans pour autant améliorer la sensibilité de façon significative.

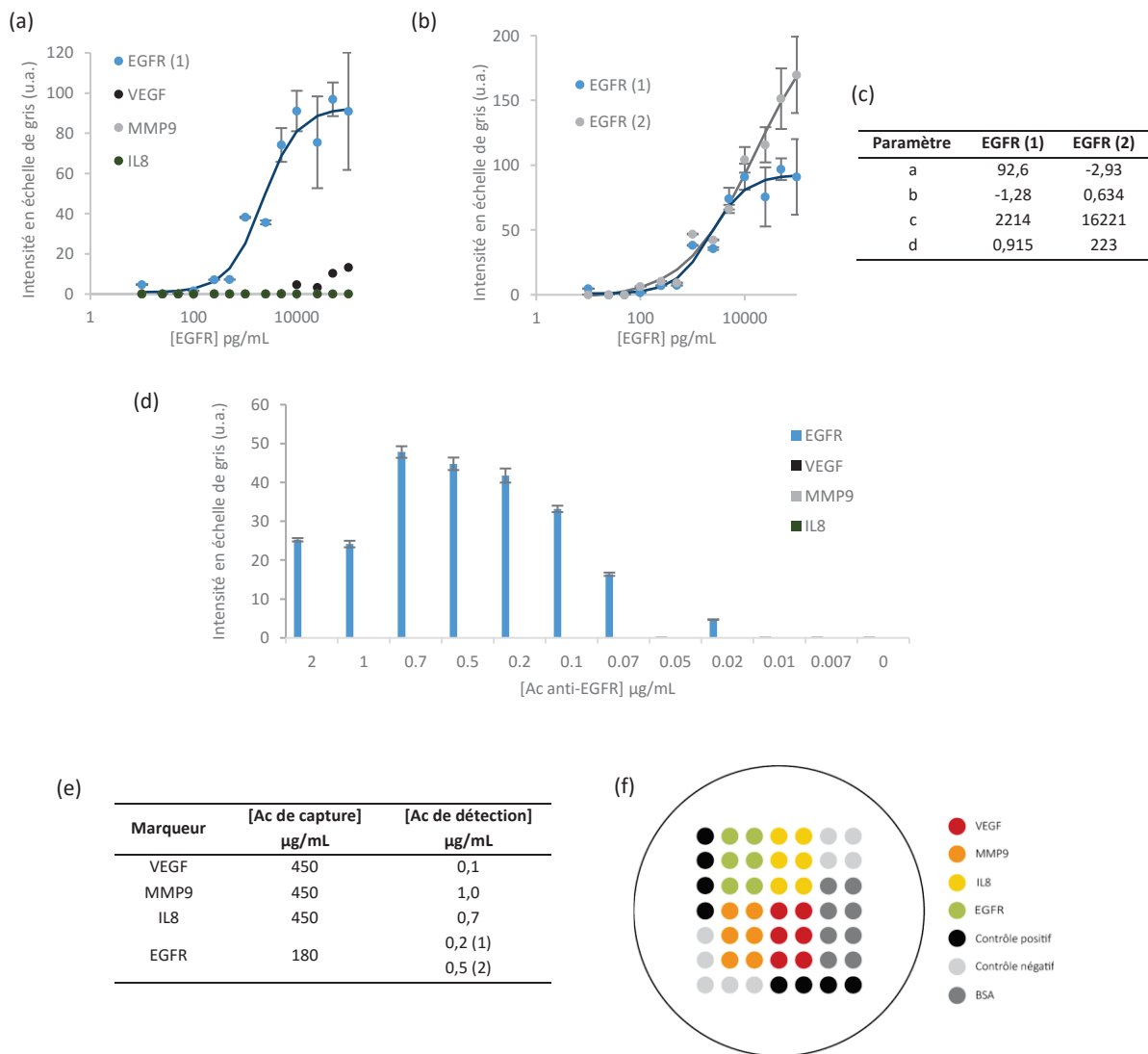


Figure 9-6. Intégration du marqueur EGFR. (a) Courbe d'étalonnage d'EGFR (b) Courbes d'étalonnage d'EGFR avant (1) et après (2) optimisation de la concentration en anticorps de détection anti-EGFR (c) Paramètres des courbes ajustées (d) Gamme de concentrations d'anticorps de détection anti-EGFR à une concentration d'EGFR fixe (6000 pg/mL) (e) Conditions de l'immunoessai (f) Matrice des plots. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

Enfin, l'impact de l'ajout de ce quatrième marqueur au test multiparamétrique a été évalué en comparant les résultats obtenus pour VEGF, MMP9 et IL8 par l'immunoessai à trois marqueurs avec ceux obtenus par l'immunoessai à quatre marqueurs (Figure 9-7). Peu de différences ont été observées

pour les courbes d'étalonnage d'IL8 tandis qu'une plus forte intensité de signal a été mise en évidence pour VEGF lors de l'immunoessai à quatre marqueurs (qui peut être due à une réaction croisée entre l'un des réactifs du système VEGF et l'anticorps de détection anti-EGFR). Quant à MMP9, son intensité de signal se trouve diminuée après l'intégration du marqueur EGFR, notamment avec une perte de sensibilité. Finalement, les réactions croisées concernant VEGF, MMP9 et IL8 observées avec l'immunoessai à trois marqueurs n'ont pas été modifiées par l'ajout du marqueur EGFR.

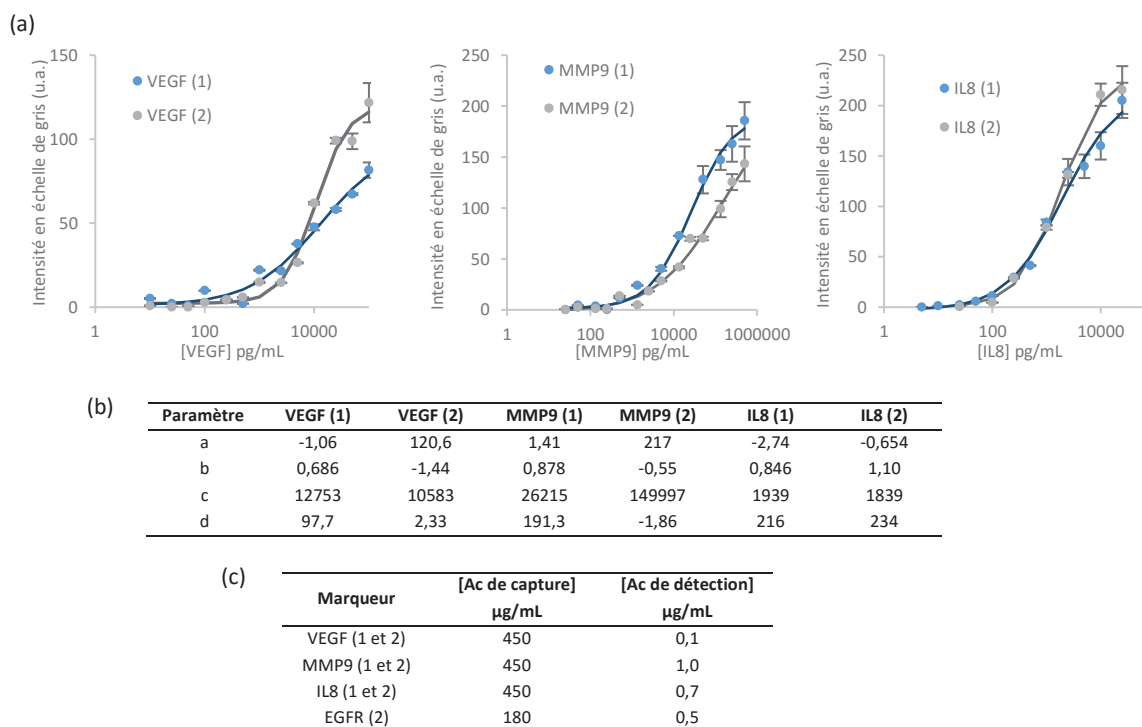


Figure 9-7. Comparaison des courbes d'étalonnages avant (1) et après (2) intégration du marqueur EGFR. (a) Courbes d'étalonnages (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai
Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

2.3. INTÉGRATION DU MARQUEUR PTGS2

Suite à la définition finale du Panel 1, le cinquième marqueur à être intégré au test multiparamétrique est PTGS2. Bien qu'il ne fasse pas partie du Panel 1, le marqueur EGFR n'a pas été immédiatement retiré du test multiparamétrique car les résultats étaient satisfaisants.

Le marqueur PTGS2 est le seul pour lequel il n'a pas été possible de trouver une paire d'anticorps (de capture et de détection) et une protéine de calibration validées par le fournisseur pour un ELISA de type sandwich. Plusieurs combinaisons de réactifs ont donc été testées. L'anticorps de capture choisi est un anticorps monoclonal pour lequel l'ELISA est une des applications possibles énoncées par le fournisseur. Plusieurs anticorps de détection ont été testés avec cet anticorps de capture. Le premier

à être testé est un anticorps polyclonal. Cependant, aucun signal n'a pu être obtenu. Un second anticorps de détection anti-PTGS2 a donc été testé. Ce dernier n'étant pas biotinylé, un anticorps secondaire polyclonal conjugué à la phosphatase alcaline a été utilisé pour la détection. Les résultats obtenus n'ont pas montré de signal spécifique pour PTGS2. Les mêmes signaux sur les plots des anticorps de capture anti-PTGS2, anti-IL8, anti-MMP9 et anti-VEGF ont été observés dans tous les puits.

Comme le montre la Figure 9-8 (a), les puits contrôles (pour lesquels l'échantillon correspond à la matrice biologique sans protéine PTGS2) donnent les mêmes signaux que les puits faisant partie de la gamme de concentration PTGS2. Il y a donc une interaction non spécifique de l'anticorps secondaire avec les anticorps de capture anti-PTGS2, anti-IL8, anti-MMP9 et anti-VEGF. Ce résultat n'était pas attendu puisque l'anticorps secondaire est un anti-IgG de lapin développé chez la chèvre, ne devant pas interagir avec les anticorps de capture (tous développés chez la souris). Une autre explication de cette réaction croisée pourrait être l'interaction non spécifique de l'anticorps de détection anti-PTGS2 avec les anticorps de capture. Un deuxième anticorps secondaire anti-IgG de lapin a alors été testé. Contrairement au premier anticorps, celui-ci est monoclonal. Aucun signal n'a été détecté sur les plots d'anticorps de capture anti-PTGS2. Tous les puits, dont les contrôles, présentent le même signal non spécifique sur les plots d'anticorps de capture anti-EGFR (Figure 9-8, b). Les signaux sont donc différents de ceux obtenus avec l'anticorps secondaire polyclonal. Cela confirme que l'interaction non spécifique concerne effectivement l'anticorps secondaire et non l'anticorps de détection anti-PTGS2.

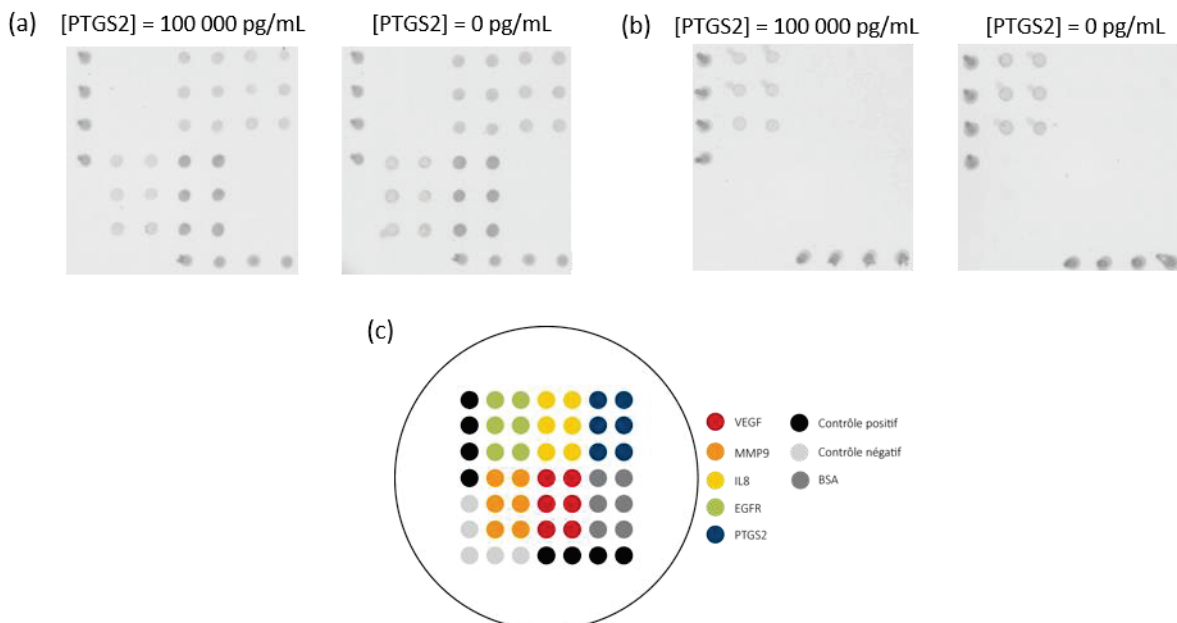


Figure 9-8. Signaux non spécifiques des anticorps pour la détection de PTGS2. (a) Images de puits en présence et en absence de protéine, détection avec l'anticorps secondaire polyclonal (b) Images de puits en présence et en absence de protéine, détection avec l'anticorps secondaire monoclonal (c) Matrice de plots

Outre le problème de signaux non spécifiques dus à l'anticorps secondaire, il existe aussi une absence de signal spécifique au marqueur PTGS2. Nous avons donc évalué la protéine de calibration PTGS2

comme cause possible de cette absence de signal. Les tests présentés précédemment ont été réalisés avec une protéine recombinante contenant uniquement les acides aminés 187 à 425 de la protéine PTGS2 humaine. La protéine entière (604 acides aminés), présentant plus de possibilités d'interaction avec les anticorps anti-PTGS2, a donc ensuite été testée (avec l'anticorps de détection anti-PTGS2 non biotinylé et l'anticorps secondaire monoclonal anti-IgG de lapin). Cette protéine n'a cependant pas permis d'obtenir un signal spécifique, seuls des signaux non spécifiques similaires à la Figure 9-8 (b) ont été observés. De même, l'analyse d'échantillons de patients provenant de l'étude pilote de sélection de biomarqueurs a donné des résultats similaires, sans signal spécifique.

Enfin, une dernière protéine recombinante a été évaluée. Elle a été produite par Lionex, un des partenaires du projet DIPROMON. Un signal spécifique a cette fois été observé sur les plots d'anticorps de capture anti-PTGS2. Comme le montre la Figure 9-9, une courbe d'étalonnage a pu être obtenue. Bien que la concentration en anticorps de détection anti-PTGS2 ait été augmentée jusqu'à 5 µg/mL, l'intensité du signal est faible avec une valeur maximale d'environ 10 u.a. dans l'urine. L'intensité maximale et la sensibilité sont améliorées lorsque l'immunoessai est réalisé dans le LowCross-Buffer® mais l'intensité reste faible. On retrouve également toujours un signal non spécifique sur les plots d'anticorps de capture anti-EGFR.

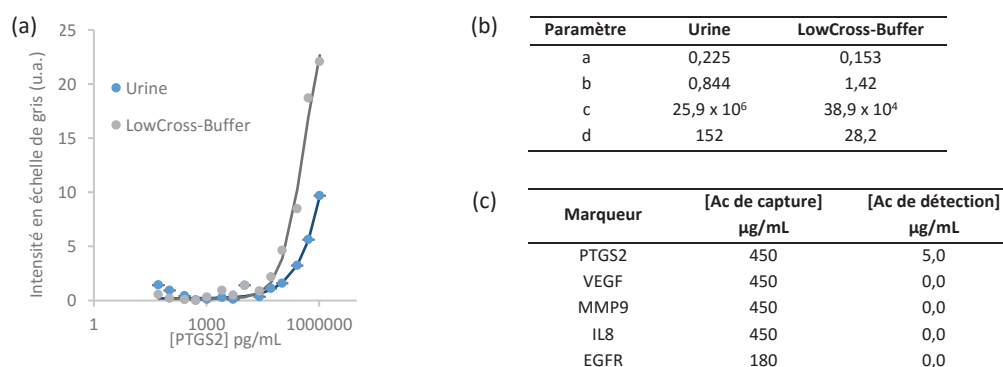


Figure 9-9. Immunoessai pour la quantification de PTGS2 avec la protéine recombinante produite par Lionex. (a) Courbes d'étalonnage dans l'urine humaine et le LowCross-Buffer (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

Les anticorps anti-PTGS2 décrits dans les tests ci-dessus ont été plus amplement évalués par Lionex grâce à une technique analytique optique, l'interférométrie de bio-couche (avec une plateforme Octet® de ForteBio). Cette méthode permet la mesure des interactions entre protéines par analyse de la configuration des interférences d'une lumière blanche réfléchiée par deux surfaces : une couche de protéines immobilisées et une couche de référence interne. Lors d'un changement du nombre de molécules liées au capteur, il y a un décalage de la configuration des interférences. Ce décalage peut être mesuré en temps réel et fournit des informations sur la cinétique d'association et de dissociation de deux protéines.

Lionex a d'abord évalué le potentiel des anticorps pour la détection de la protéine PTGS2 recombinante immobilisée à la surface du biocapteur. Les anticorps évalués sont l'anticorps monoclonal (clone AS66) utilisé sur notre plateforme comme anticorps de capture, l'anticorps polyclonal biotinylé et l'anticorps polyclonal non conjugué (tous deux utilisés sur notre plateforme comme anticorps de détection). Les résultats ont montré une forte affinité entre l'anticorps polyclonal non conjugué et la protéine PTGS2, avec une constante d'affinité K_a de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Les deux autres anticorps n'ont pas montré d'affinité avec la protéine. Le potentiel de capture de la protéine a ensuite été évalué par immobilisation des anticorps sur la surface du biocapteur. L'anticorps monoclonal semble alors avoir une bonne affinité avec la protéine ($K_a = 3,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). L'anticorps polyclonal biotinylé a lui une affinité correcte avec la protéine ($K_a = 2,72 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) tandis que l'anticorps polyclonal non conjugué n'a montré aucune affinité. Enfin, Lionex a procédé à un criblage de paires d'anticorps en évaluant toutes les combinaisons possibles d'anticorps de capture et de détection avec les trois anticorps anti-PTGS2 et en mesurant la cinétique de liaison des protéines sous un format d'immunoessai de type sandwich (Figure 9-10). La meilleure combinaison correspond à l'anticorps monoclonal comme anticorps de capture et l'anticorps polyclonal non conjugué comme anticorps de détection (tous deux à une concentration de $10 \mu\text{g/mL}$). C'est cette combinaison qui avait été utilisée sur notre plateforme dans les tests précédents. Une autre combinaison semble également fonctionner : l'anticorps polyclonal biotinylé comme anticorps de capture puis l'anticorps polyclonal non conjugué comme anticorps de détection (tous deux également à une concentration de $10 \mu\text{g/mL}$).

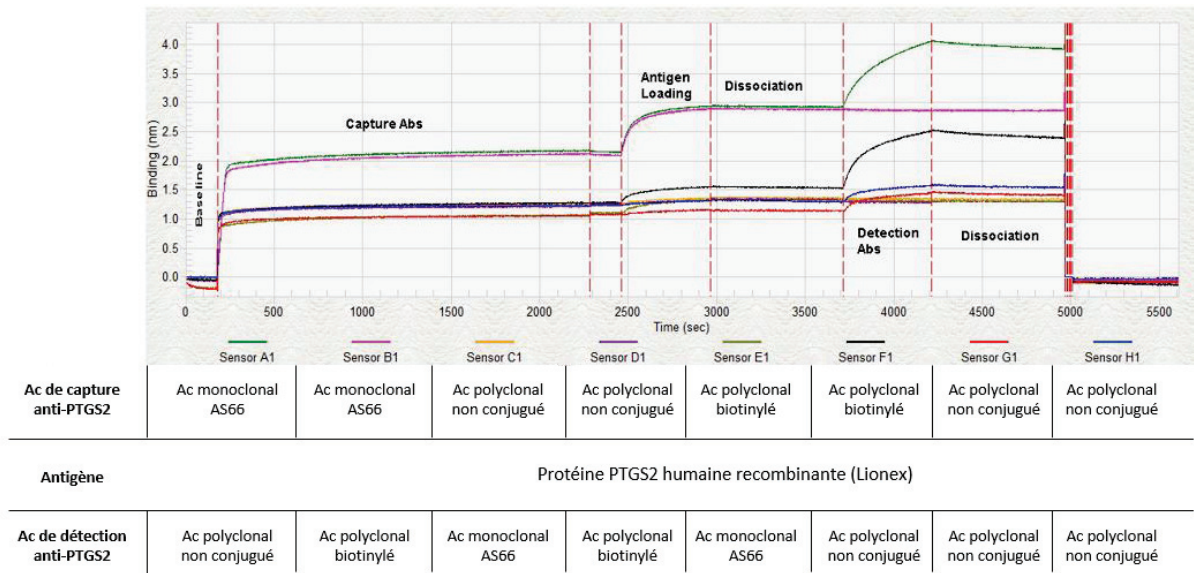


Figure 9-10. Criblage de paires d'anticorps par interférométrie de bio-couche. Ab, anticorps

Les résultats de Lionex sont concordants avec ceux obtenus sur notre plateforme. Ils ne remettent donc pas en cause notre format de détection de marqueurs et confirment que les anticorps utilisés sont la cause de l'absence de signal.

2.4. CAS PARTICULIER DU MARQUEUR EN2

Le dernier marqueur du Panel 1 à devoir être intégré à l'immunoessai multiparamétrique est EN2. Cependant, un partenaire de DIPROMON, l'Université de Surrey, a précédemment démontré que de meilleures performances étaient obtenues pour ce marqueur par un immunoessai en format direct. Nous avons donc développé un immunoessai monoparamétrique en mode direct à part, selon un protocole élaboré par l'Université de Surrey (voir la Figure 7-2 et Morgan *et al*, 2013). L'anticorps de détection anti-EN2 n'étant pas biotinylé, un anticorps anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase de raifort a été utilisé.

Cet immunoessai n'a cependant donné aucun signal avec une protéine EN2 ou un peptide. Une courbe d'étalonnage a néanmoins pu être obtenue en utilisant un échantillon urinaire de patient atteint de cancer de la vessie (Figure 9-11). Il a donc été mis en évidence que l'absence de signal provenait de la protéine utilisée et non de l'anticorps anti-EN2. Cette courbe a notamment été utilisée lors de l'étude pilote de la sélection des biomarqueurs.

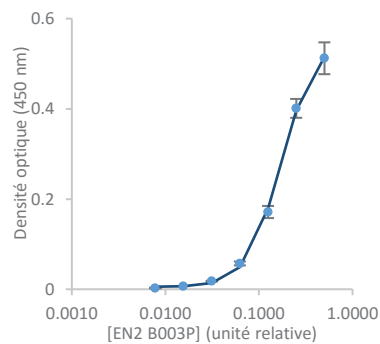


Figure 9-11. Courbe d'étalonnage d'EN2 en utilisant un échantillon urinaire de patient (B003P). Paramètres de la courbe ajustée : $a = 0,552$; $b = -2,43$; $c = 0,171$; $d = 0,00536$. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 3 analyses.

Il a ensuite été décidé d'arrêter le développement de cet immunoessai sur notre plateforme car celui-ci est incompatible avec notre format d'immunoessai multiparamétrique de type sandwich. Il a été pris en charge par un autre partenaire du projet, l'Austrian Institute of Technology.

3. MODIFICATION DE SUPPORT

Le support initial des immunoessais était un adhésif (TKL) assemblé à une plaque 96-puits sans fond. Dû à des difficultés d'approvisionnement en adhésif, un nouveau support a été choisi. La plateforme a donc été de nouveau développée avec des plaques 96-puits en polystyrène. Nous avons tout d'abord choisi des plaques proposées par Scienion : les sciPLEXPLATES. Ce sont des plaques optimisées pour des applications de type biopuces. Plus précisément, les sciPLEXPLATES de Type 2 sont recommandées pour des puces à protéines et des ELISA en format multiplexe. Elles sont en format de barrettes (12 barrettes de 8 puits). Le *coating* effectué par le fabricant sur les plaques de Type 2 permet l'optimisation de l'adsorption des protéines et la réduction des liaisons non spécifiques.

Le changement de support entraîne également d'autres modifications. Tout d'abord, le tampon sciSPOT PROTEIN commercialisé par Scienion remplace le tampon de dépôt des sondes de fabrication interne d'AXO Science (Figure 9-12). Un autre avantage des sciPLEXPLATES est la configuration des puits en barrettes qui peuvent être détachées et déplacées sur la plaque. Cela apporte plus de flexibilité d'utilisation.

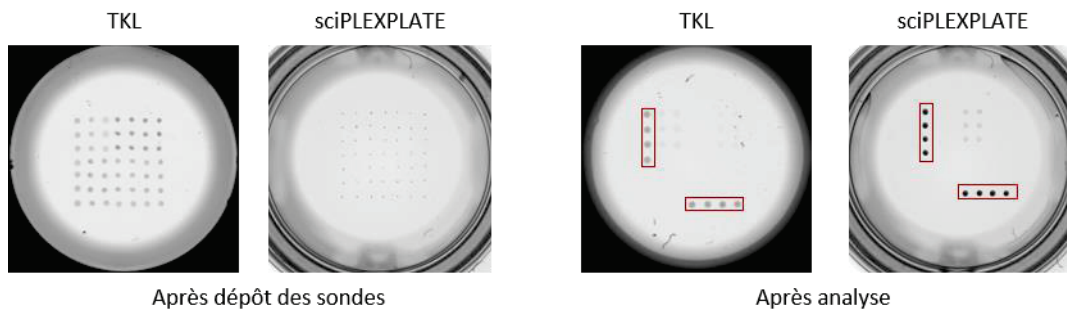


Figure 9-12. Comparaison des deux supports. (a) Images de puits après dépôt des sondes (b) Images des mêmes puits après analyse. Les plots de témoins positifs sont encadrés.

Des modifications ont également été réalisées au niveau du protocole de l'immunoessai multiparamétrique, principalement au niveau des étapes de détection (voir Section 2.2 du Chapitre 7). La phosphatase alcaline a été remplacée par la peroxydase de raifort et le substrat utilisé est celui de Scienion (sciCOLOR T2). Les conditions d'incubation recommandées sont aussi modifiées et le lavage final des puits a été supprimé (il y a seulement aspiration de la solution de substrat).

Enfin, nous avons cherché à identifier une deuxième référence de plaque 96-puits similaire afin de diminuer les risques liés à un fournisseur unique. Ainsi, nous avons sélectionné la plaque 96-puits MICROLON® 200 de Greiner Bio-One. Elle présente des propriétés similaires à la sciPLEXPLATE de Type 2. Ce sont des plaques en polystyrène comportant 12 barrettes de 8 puits qui ont subi un traitement permettant une fixation moyenne des protéines (capacité d'adsorption de 200 ng d'IgG de souris par cm²). Une comparaison des résultats obtenus avec les deux plaques a été réalisée. Pour cela, des

Résultats et discussion

barrettes des deux types ont été disposées sur une même plaque. Après le dépôt des sondes, la plaque mixte a été analysée selon le protocole d'immunoessai de type sandwich décrit précédemment. La comparaison des courbes d'étalonnage obtenues pour VEGF, MMP9 et IL8 montre des résultats très similaires entre les deux supports (Figure 9-13). Il est donc possible d'utiliser à la fois les sciPLEXPLATES de Type 2 et les plaques MICROLON® 200.

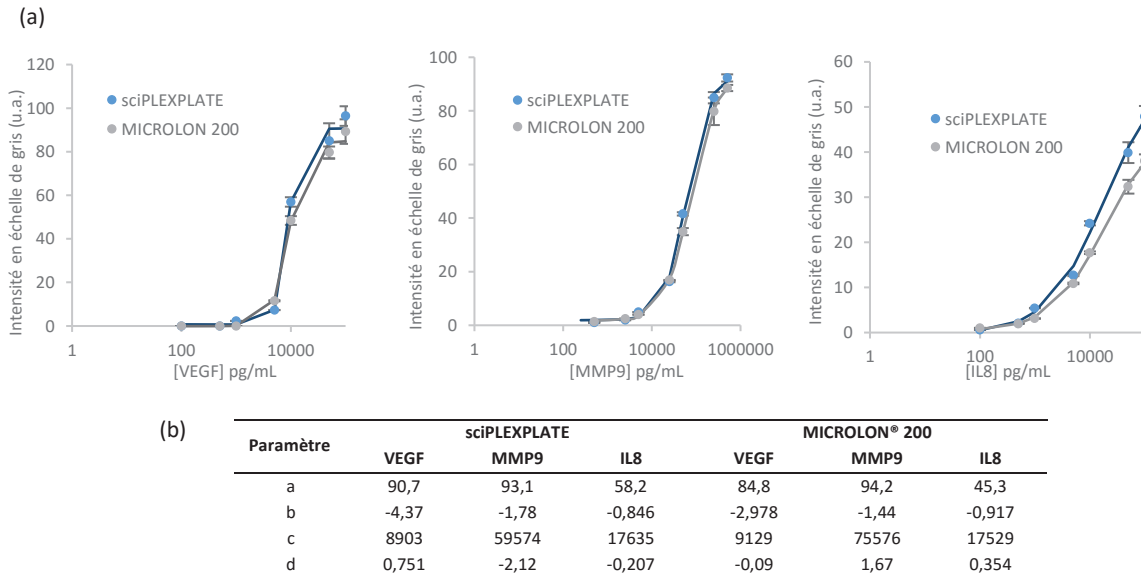


Figure 9-13. Comparaison des résultats d'analyse selon le type de plaque. (a) Courbes d'étalonnage de VEGF, MMP9 et IL8 (b) Paramètres des courbes ajustées. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

4. DÉVELOPPEMENT DU PANEL 1 AVEC LE NOUVEAU SUPPORT

4.1. IMMUNOESSAI MULTIPARAMÉTRIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE VEGF, MMP9 ET IL8

L'immunoessai multiparamétrique pour la quantification du Panel 1 a été de nouveau développé sur le nouveau support. Le développement a débuté par les marqueurs VEGF, MMP9 et IL8 (la matrice, correspondant à celle utilisée avant la modification de support, contient également des plots d'anticorps de capture anti-PTGS2). Comme le montre la Figure 9-14 (a), il a été possible d'obtenir une courbe d'étalonnage pour les trois protéines. Contrairement à ce qui a été observé lors des premiers immunoessais sur l'ancien support, on ne retrouve pas de réaction croisée.

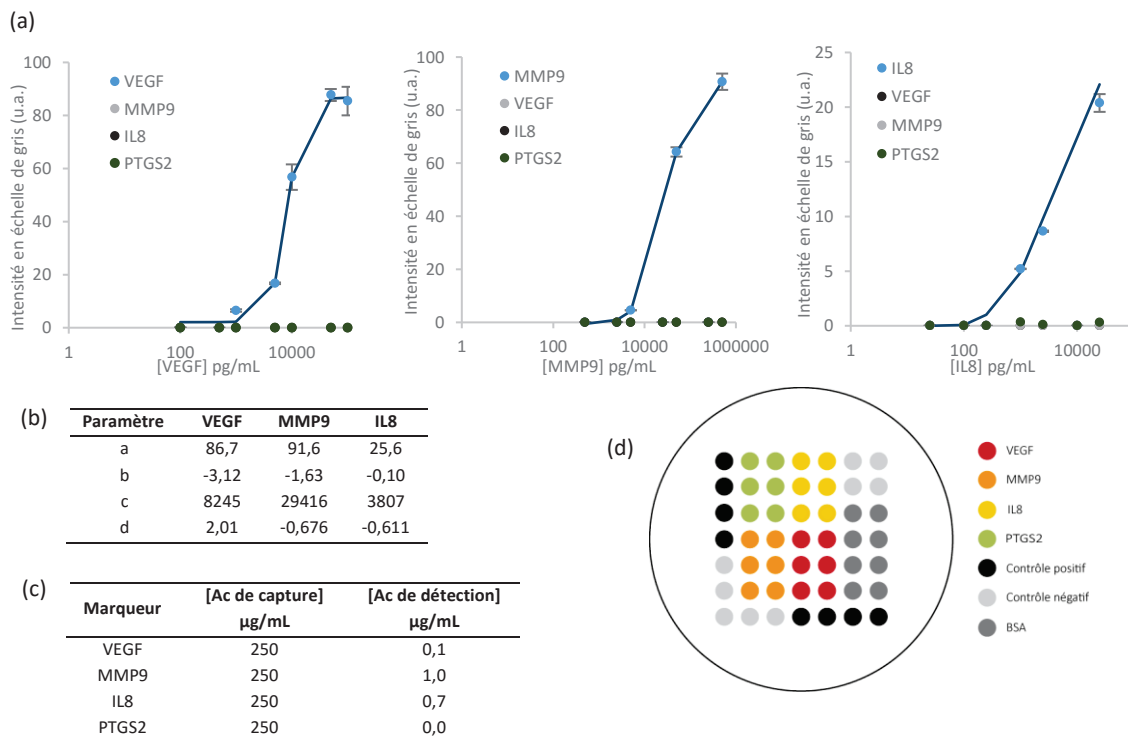


Figure 9-14. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9 et IL8. (a) Courbes d'étalonnage (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai (d) Matrice de plots. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

Les premiers tests ont été effectués avec les concentrations optimales en anticorps de détection déterminées sur l'ancien support. Les concentrations en anticorps de capture ont cependant été modifiées du fait de l'utilisation d'un tampon de dépôt des sondes ne permettant pas de dilutions aussi faibles que celles effectuées avec l'ancien tampon (Figure 9-14, c). De plus, cette première phase de développement a été réalisée avec un anticorps de capture polyclonal anti-IL8 produit par Lionex, remplaçant l'anticorps monoclonal commercial précédemment utilisé. Cependant, les signaux obtenus pour la courbe d'étalonnage d'IL8 sont de faible intensité. Une amélioration de l'intensité du signal a

été possible par augmentation de la concentration en anticorps de détection (de 0,7 µg/mL à 2 µg/mL) mais cette augmentation est insuffisante et ne permettrait pas d'obtenir une limite de détection acceptable (inférieure à 500 pg/mL). Après comparaison avec les signaux obtenus avec l'anticorps de capture anti-IL8 commercial (Figure 9-15), il a été décidé de ne pas sélectionner l'anticorps produit par Lionex.

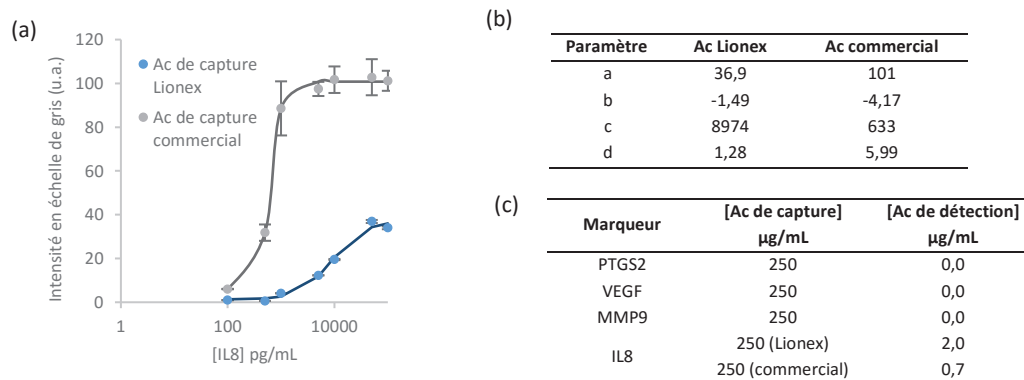


Figure 9-15. Immunoessai pour la quantification d'IL8. (a) Courbes d'étalonnage avec l'anticorps de capture commercial et l'anticorps de capture produit par Lionex (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

Enfin, suite à l'utilisation du nouveau support, une nouvelle détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-IL8 a été effectuée. En effet, on observe un signal fort aux plus hautes concentrations d'IL8 et la formation d'un plateau. Une gamme d'anticorps de détection a été réalisée afin d'évaluer la possibilité de diminuer la concentration en anticorps sans perte de performance de l'immunoessai. Comme le montre la Figure 9-16 (a), la diminution de la concentration en anticorps de détection anti-IL8 n'entraîne pas de baisse de l'intensité du signal. Il a donc été décidé d'utiliser une concentration de 0,1 µg/mL pour la suite du développement. La comparaison des courbes d'étalonnage d'IL8 avec une concentration en anticorps de détection de 0,7 µg/mL et de 0,1 µg/mL ne montre pas de différence significative (Figure 9-16, b).

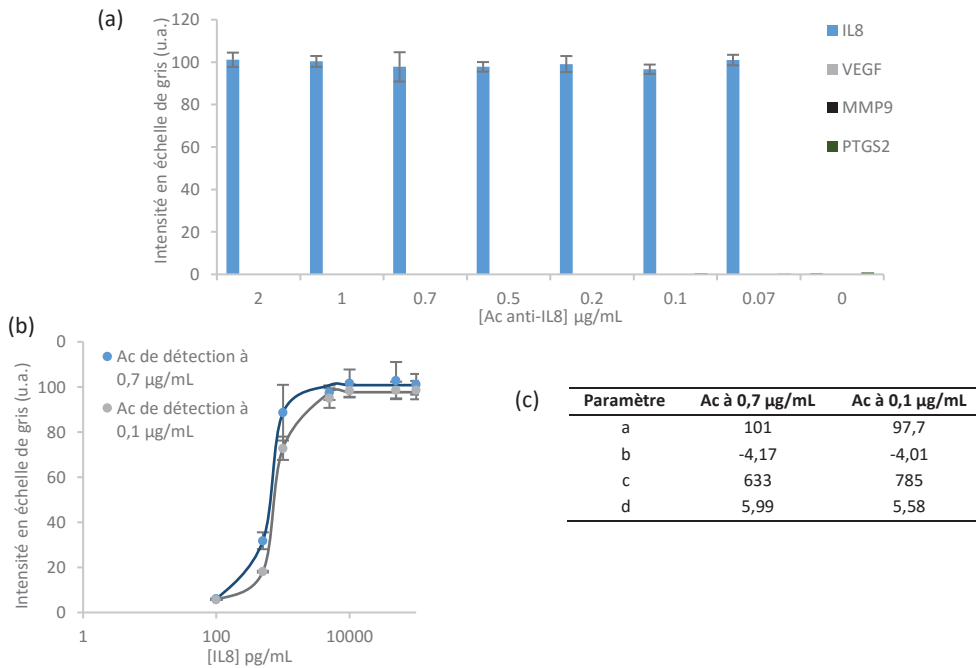


Figure 9-16. Détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-IL8. (a) Gamme de concentrations d'anticorps de détection anti-IL8 à une concentration d'IL8 fixe (10 000 pg/mL) (b) Courbes d'étalonnage d'IL8 à deux concentrations d'anticorps de détection anti-IL8 différentes (c) Paramètres des courbes ajustées. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

4.2. INTÉGRATION DU MARQUEUR PTGS2

Comme pour l'ancien support, nous avons effectué plusieurs tests pour inclure le marqueur PTGS2 dans l'immunoessai multiparamétrique. Il n'a pas été possible d'obtenir un signal spécifique sur les plots d'anticorps de capture anti-PTGS2 même lorsque l'immunoessai comprend la meilleure combinaison d'anticorps déterminée par Lionex, correspondant à l'anticorps monoclonal comme anticorps de capture et l'anticorps polyclonal non conjugué comme anticorps de détection.

L'intégration du marqueur PTGS2 n'a donc pour l'instant pas été concluante. Bien que l'évaluation par Lionex des anticorps ait montré que l'immunoessai pouvait fonctionner avec une certaine paire d'anticorps et la protéine recombinante de Lionex, nous n'avons pas obtenus de résultats satisfaisants sur notre plateforme. De plus, la meilleure combinaison d'anticorps n'a pas permis non plus la détection de la protéine PTGS2 dans les échantillons de patients. Il ne semble donc pas viable de continuer à vouloir intégrer ces réactifs à l'immunoessai multiparamétrique. L'intégration du marqueur PTGS2 a donc été mise en suspens en attendant la production d'une nouvelle paire d'anticorps par Lionex.

4.3. CONCLUSION

Bien que le changement de support ait apporté des modifications de certains paramètres de l'immunoessai (notamment les concentrations en anticorps de capture), des résultats satisfaisants ont été obtenus pour les marqueurs VEGF, MMP9 et IL8. De plus, le nouveau support présente plusieurs avantages. L'intérêt premier est sa disponibilité et la possibilité d'utiliser deux références différentes. Il permet également de faciliter la préparation des puces : les plaques peuvent être utilisées telles quelles tandis que l'ancien support nécessitait une étape d'assemblage de l'adhésif à une plaque 96-puits sans fond. Enfin, ce nouveau support présente une flexibilité d'utilisation grâce à sa configuration en barrettes. Cette configuration a été bénéfique au développement de l'immunoessai puisqu'il était possible de conserver une partie de la puce préparée pour une utilisation ultérieure.

En parallèle du développement du Panel 1, la seconde étude pour la sélection de biomarqueurs a été réalisée, définissant un deuxième panel. La définition finale du Panel 2 a donc entraîné l'arrêt du développement de l'immunoessai multiparamétrique pour le Panel 1 et son orientation vers le Panel 2.

5. DÉVELOPPEMENT DU PANEL 2

Le Panel 2 comprend les marqueurs suivants : VEGF, IL8, IL6, CDH1, ErbB2 et EN2. Trois de ces marqueurs (VEGF, IL8 et EN2) faisaient également partie du Panel 1, dont deux étaient intégrés à l'immunoessai multiparamétrique. Ainsi, pour établir une transition entre ces deux panels, le marqueur PTGS2 a été retiré de l'immunoessai multiparamétrique et a été remplacé par IL6.

Le développement de l'immunoessai pour le Panel 2 a donc débuté par les marqueurs VEGF, MMP9, IL8 et IL6. Le marqueur MMP9 ne fait pas partie du Panel 2 mais il a été décidé de ne pas l'exclure de l'immunoessai car ses performances analytiques dans l'immunoessai multiparamétrique étaient satisfaisantes. De plus, bien qu'il n'ait pas été sélectionné lors de la seconde étude, il a démontré de bonnes performances diagnostiques dans l'étude pilote et était le meilleur marqueur en termes de performances individuelles (voir Tableau 8-2).

Par la suite, les marqueurs CDH1 et ErbB2 ont également été intégrés à l'immunoessai.

5.1. IMMUNOESSAI MULTIPARAMÉTRIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE VEGF, MMP9, IL8 ET IL6

La Figure 9-17 décrit les principaux résultats de la conception du test multiparamétrique contenant les marqueurs VEGF, MMP9, IL8 et IL6. Il a été possible d'obtenir une courbe d'étalonnage pour les quatre protéines (Figure 9-17, a). Les concentrations en anticorps de détection initialement choisies étaient celles déterminées lors du développement du Panel 1.

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus à la fin du développement du Panel 1 afin d'évaluer l'influence du remplacement du marqueur PTGS2 par IL6 dans l'immunoessai multiparamétrique (Figure 9-18). Les courbes de VEGF, MMP9 et IL8 sont similaires dans les deux configurations du test. Il ne semble donc pas que le marqueur IL6 apporte des modifications aux performances des autres dosages.

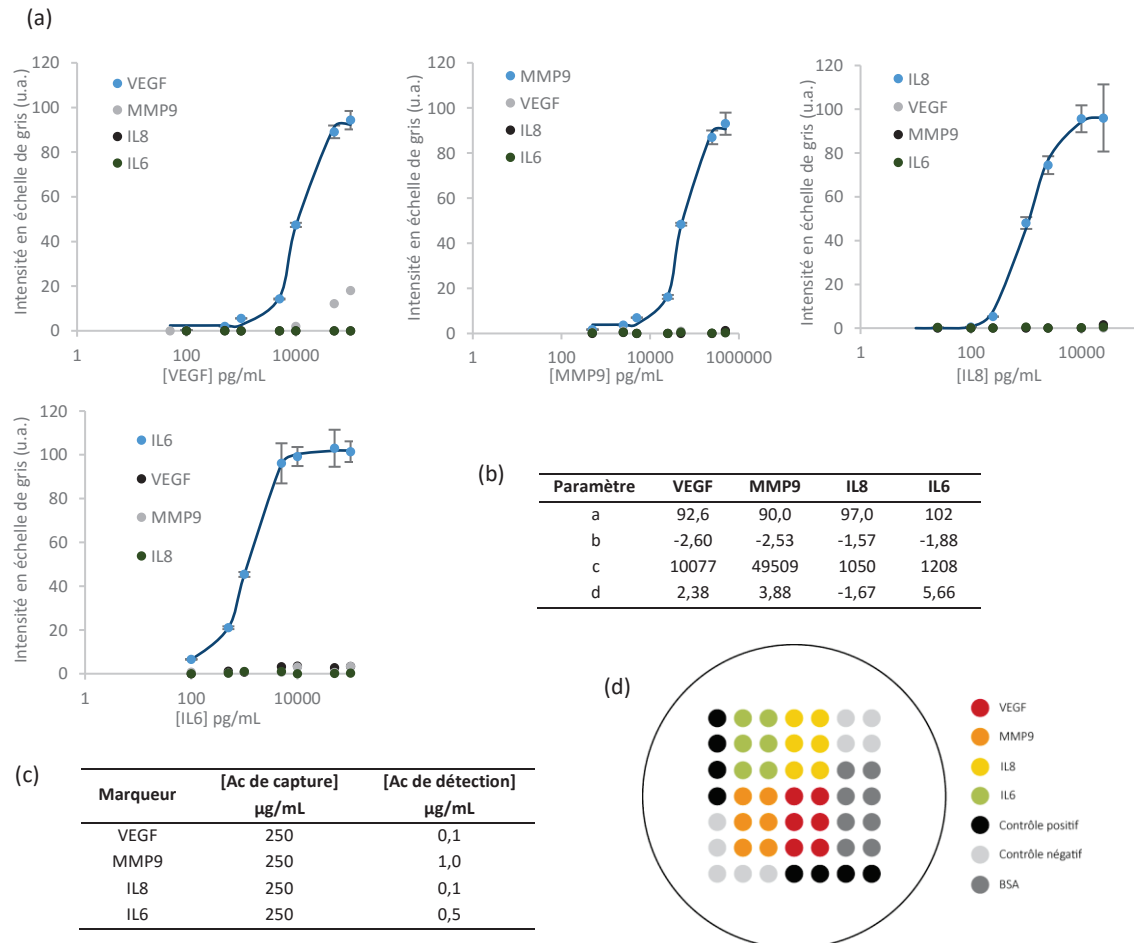


Figure 9-17. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9, IL8 et IL6. (a) Courbes d'étalonnage (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai (d) Matrice de plots
Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

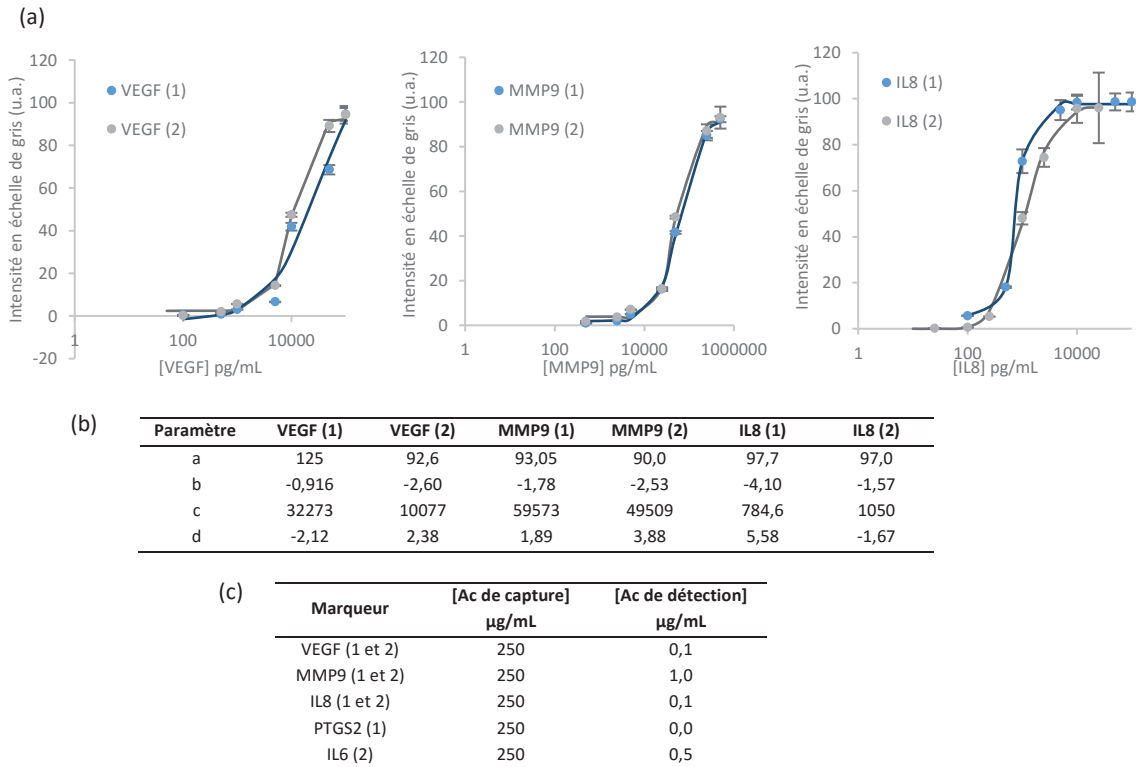


Figure 9-18. Comparaison des courbes d'étalonnage avant (1) et après (2) retrait du marqueur PTGS2 et intégration du marqueur IL6. (a) Courbes d'étalonnage (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

5.1.1. RÉACTION CROISÉE

Les courbes présentées dans la Figure 9-17 (a) permettent de détecter certaines formes de réaction croisée. On remarque alors qu'il y a très peu de réaction croisée. Il existe un signal non spécifique sur les plots d'anticorps de capture anti-MMP9 dans les puits de la gamme d'étalonnage de VEGF. Le signal semble diminuer lorsque la concentration en VEGF diminue, il peut donc s'agir d'une interaction entre la protéine VEGF et les anticorps de capture anti-MMP9. Cette réaction avait déjà été observée au début du développement du Panel 1 (voir Figure 9-3). Néanmoins, elle est ici beaucoup plus faible : pour une concentration en protéine VEGF de 100 000 pg/mL, le signal sur les plots d'anticorps de capture anti-MMP9 a une intensité de 18 u.a. tandis que lors du développement du Panel 1 (sur l'ancien support), l'intensité était de 61 u.a..

Pour VEGF, MMP9 et IL8, la réaction croisée a également été analysée en mettant en présence les trois protéines dans le même puits. Cette évaluation a été réalisée de façon similaire à celle effectuée lors du développement du Panel 1 (voir la section 2.1.1 de ce chapitre). Les résultats sont présentés dans la Figure 9-19. Le signal non spécifique de la protéine VEGF sur les plots d'anticorps de capture anti-MMP9 est retrouvé sur l'histogramme (a) ainsi que sur l'histogramme (b). Sur ce dernier, l'intensité du

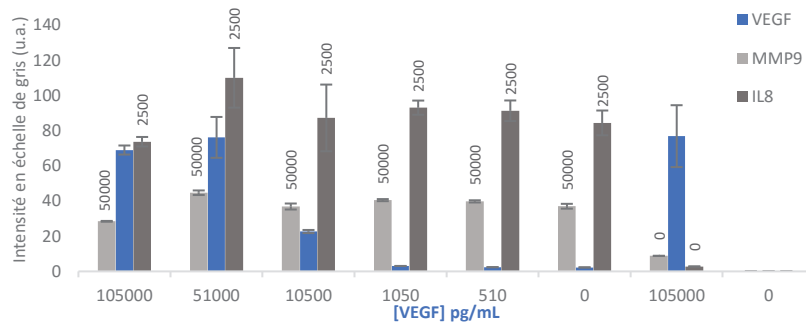
signal MMP9 à la concentration en MMP9 de 490 000 pg/mL est plus élevée en présence de VEGF (et IL8) que lorsque la protéine MMP9 est seule.

On remarque également que l'intensité du signal VEGF, à concentration en protéine VEGF égale, est environ deux fois plus élevée lorsque la concentration en MMP9 est élevée (490 000 pg/mL) que lorsqu'elle est plus basse ou égale à zéro. Ce phénomène n'est pas visible sur les courbes d'étalonnage, lorsque les protéines sont seules dans chaque puits (Figure 9-17). Il est donc possible que la protéine MMP9 (à forte concentration) interagisse avec la protéine VEGF, ce qui augmente le signal localisé au niveau des plots d'anticorps de capture anti-VEGF lorsque ces derniers interagissent eux-mêmes avec VEGF (selon le schéma (v) de la Figure 2-3).

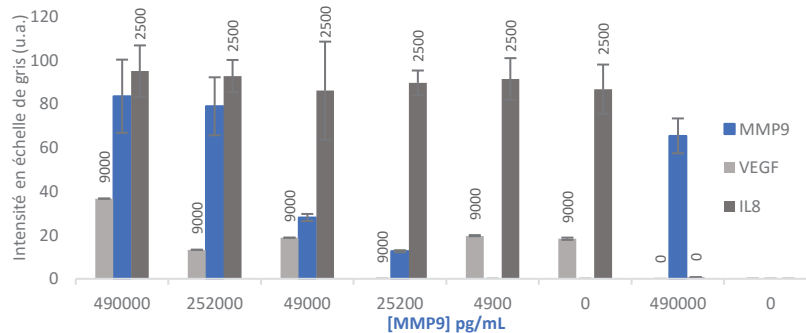
Enfin, le dernier histogramme met en avant un signal non spécifique sur les plots d'anticorps de capture anti-VEGF en présence d'IL8 seule. Cette réaction croisée n'avait pas été observée lors de l'établissement des courbes d'étalonnage.

Développement d'une plateforme d'immunoessais pour la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie

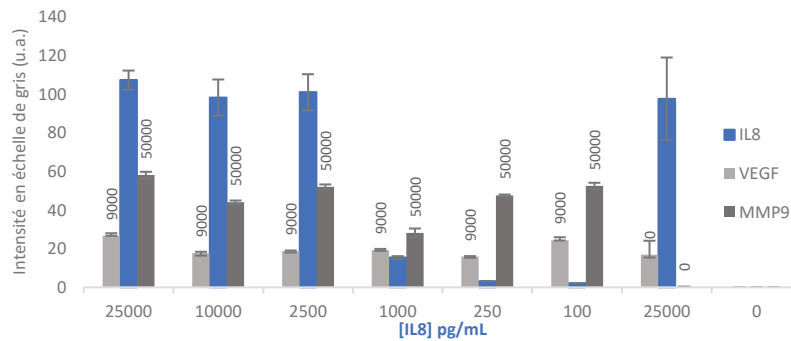
(a) Détection de VEGF (contaminants : MMP9 et IL8)



(b) Détection de MMP9 (contaminants : VEGF et IL8)



(c) Détection d'IL8 (contaminants : VEGF et MMP9)



(d)

Marqueur	[Ac de capture] µg/mL	[Ac de détection] µg/mL
VEGF	250	0,1
MMP9	250	1,0
IL8	250	0,1

Figure 9-19. Évaluation de la réaction croisée de VEGF, MMP9 et IL8 (a, b et c). (d) Conditions de l'immunoessai. Les valeurs affichées sur les barres correspondent aux concentrations en pg/mL des contaminants. Une valeur est manquante sur l'histogramme b (valeur de VEGF pour [MMP9] = 25200 pg/mL). Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

5.1.2. STRATÉGIES D'OPTIMISATION

Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour améliorer les performances analytiques de l'immunoessai multiparamétrique. Nous avons tout d'abord optimisé la concentration en anticorps de détection du dernier marqueur intégré à la plateforme. Une gamme de concentrations d'anticorps de détection anti-IL6 a donc été réalisée (Figure 9-20, a). L'intensité du signal est relativement constante jusqu'à une concentration de 0,05 µg/mL. Une baisse du signal est observée à partir de 0,02 µg/mL. Nous avons sélectionné une concentration optimale de 0,1 µg/mL (une concentration plus basse n'a

pas été choisie pour des raisons pratiques de précision lors de la dilution de la solution mère d'anticorps). Une comparaison des résultats obtenus avec l'ancienne concentration (0,5 µg/mL) et la concentration sélectionnée montre des courbes d'étalonnage similaires (Figure 9-20, b).

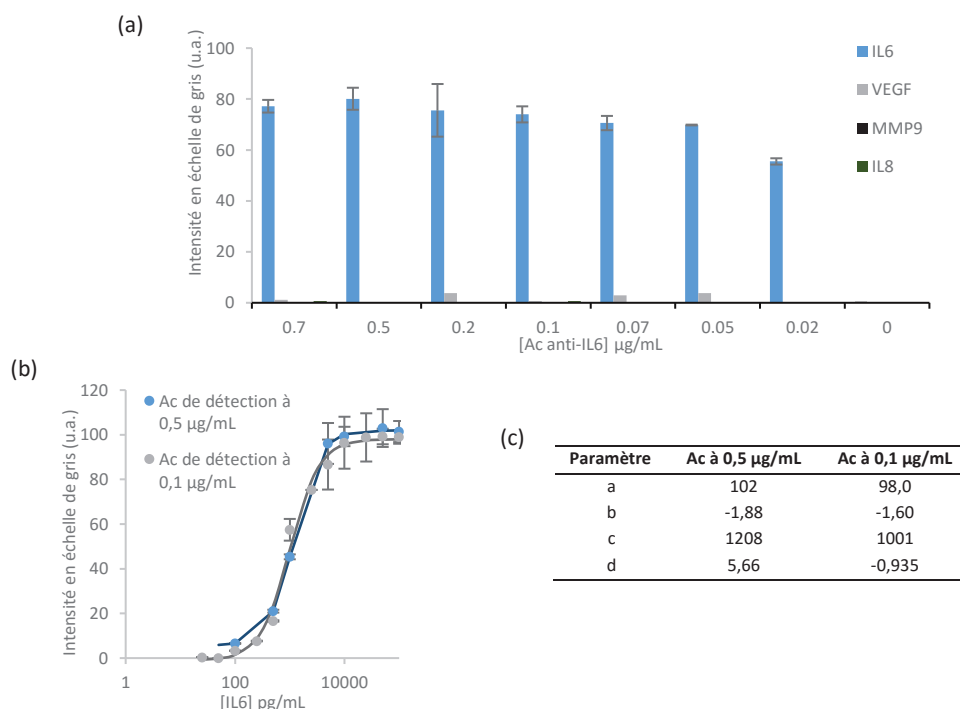


Figure 9-20. Détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-IL6 (a) Gamme de concentrations d'anticorps de détection anti-IL6 à une concentration d'IL6 fixe (2 500 pg/mL). (b) Courbes d'étalonnage d'IL6 à deux concentrations d'anticorps de détection anti-IL6 différentes (c) Paramètres des courbes ajustées
Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

Une fois que toutes les concentrations en anticorps de détection ont été optimisées, une évaluation des limites de détection et de quantification a été effectuée. L'estimation de ces limites est basée sur la lecture de n mesures de blancs d'analyse sur des échantillons contenant l'ensemble des constituants à l'exception de la substance à rechercher (le marqueur). Concernant notre plateforme, il s'agit donc de la mesure des intensités des plots d'anticorps de capture du marqueur d'intérêt dans les puits de contrôle. Les limites de détection et de quantification sont ensuite calculées grâce aux formules suivantes :

$$L_D = m_{\text{blanc}} + 3 S_{\text{blanc}}$$

$$L_Q = m_{\text{blanc}} + 10 S_{\text{blanc}}$$

m_{blanc} correspond à la moyenne des n mesures de blancs et S_{blanc} à l'écart-type des n mesures de blancs.

La limite de détection d'une méthode est la plus petite concentration de la substance analysée qui produit un signal détectable (avec une fiabilité définie) qui est statistiquement différent du signal produit par un « blanc » dans les mêmes conditions. Quant à la limite de quantification, elle correspond à la concentration minimale qui peut être quantifiée avec une fiabilité définie. Concernant les formules ci-dessus, le facteur multiplicatif 3 attribué à l'écart-type correspond à un risque de 0,13% de conclure

à la présence de la substance recherchée alors qu'elle est absente et un facteur multiplicatif 10 correspond à un risque de 0,05%.

Pour cette première évaluation des limites de détection et de quantification, douze mesures de blancs indépendants ont été réalisées (pour une validation analytique finale de méthode, le guide COFRAC recommande trente mesures de blancs). Au cours de cette même analyse, des courbes d'étalonnage pour chaque protéine ont été réalisées. Les résultats sont décrits dans le Tableau 9-1. Pour chaque puits blanc, l'intensité de signal de l'ensemble des plots de chaque anticorps de capture a été calculée puis corrigée par la formule décrite dans la section 2.3 du Chapitre 7. La moyenne et l'écart-type de tous les puits blancs ont ensuite été calculés pour déterminer les limites de détection et de quantification. Ces limites étant exprimées en intensité de signal (u.a.), les formules inverses des courbes ajustées ont été utilisées pour convertir les résultats en concentrations.

Tableau 9-1. Limites de détection et de quantification de VEGF, MMP9, IL8 et IL6

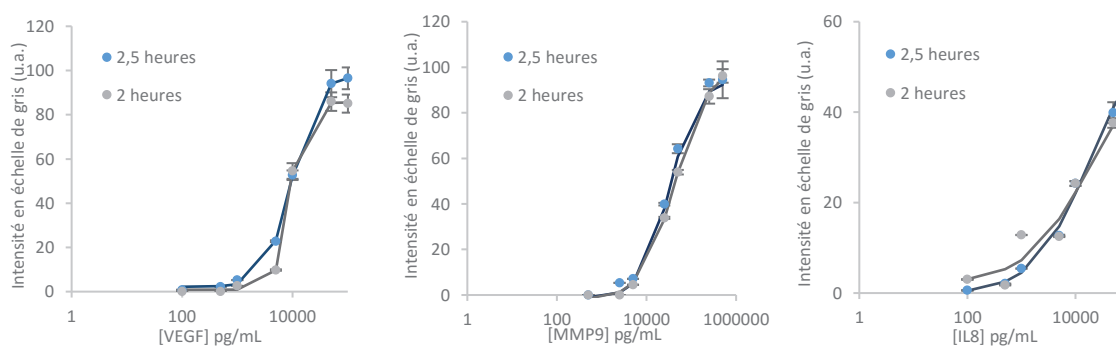
	VEGF	MMP9	IL8	IL6
Mesures des blancs en intensité de signal (u.a.)				
Moyenne	0,523	1,50	1,63	0,541
Écart-type	0,677	0,83	0,89	0,440
L_D	2,56	3,99	4,29	1,86
L_Q	7,30	9,79	10,5	4,94
Conversion en concentration de protéine (pg/mL)				
L_D	2658	5524	72,8	83,1
L_Q	4042	11600	127	153

L_D, limite de détection ; L_Q, limite de quantification

Les marqueurs IL6 et IL8 présentent les meilleures limites de détection et de quantification. D'après une étude sur l'expression d'IL6 (Chen *et al*, 2013a), les concentrations urinaires en IL6 chez les patients atteints du cancer de la vessie varient de 80 pg/mL à 250 pg/mL selon le stade de la tumeur. Les performances du dosage d'IL6 sont donc adéquates pour son application bien que sa limite de quantification (153 pg/mL) pourrait être améliorée. Lors des études de sélection des marqueurs (Chapitre 8), IL8 a été quantifiée dans les échantillons urinaires à une concentration variant de 3 600 pg/mL à 200 pg/mL. Le dosage d'IL8 par la plateforme permet une quantification de protéine inférieure à 200 pg/mL, ses performances sont donc appropriées. Quant aux marqueurs VEGF et MMP9, la plus petite concentration quantifiée dans les échantillons urinaires était respectivement de 22 pg/mL et 750 pg/mL. Il est donc nécessaire d'améliorer les limites de quantification de ces deux marqueurs.

Lors du développement du Panel 1, une première augmentation du temps d'incubation des protéines et des anticorps de détection avait permis d'améliorer la sensibilité de l'immunoessai multiparamétrique ainsi que les limites de détection et de quantification (voir la section 2.1.2). La

durée d'incubation avait alors été définie à deux heures. Une deuxième tentative d'amélioration des performances a été réalisée en augmentant de nouveau le temps d'incubation. Cependant, l'augmentation de 30 minutes n'a pas permis une amélioration significative des performances, notamment pour MMP9 et IL8 (Figure 9-21). Il est possible qu'une durée d'incubation supérieure à 2,5 heures permette une plus grande diffusion des réactifs et donc plus d'interactions entre les protéines et les anticorps. Néanmoins, cela augmenterait le temps total de l'analyse et selon le cahier des charges du produit, ce temps maximal a été défini entre 3,5 et 4 heures. Nous avons donc décidé de ne pas dépasser les deux heures d'incubation pour les protéines et anticorps de détection.



(b)

Paramètre	Incubation de deux heures			Incubation de deux heures et demie		
	VEGF	MMP9	IL8	VEGF	MMP9	IL8
a	85,53	100	52,0	97,4	96,9	58,2
b	-3,88	-1,19	-0,768	-1,98	-1,47	-0,846
c	8678	42714	16456	9451	32215	17635
d	0,852	-2,11	2,09	2,19	1,34	-0,207

(c)

Marqueur	[Ac de capture] µg/mL	[Ac de détection] µg/mL
VEGF	250	0,1
MMP9	250	1,0
IL8	250 (Lionex)	2,0

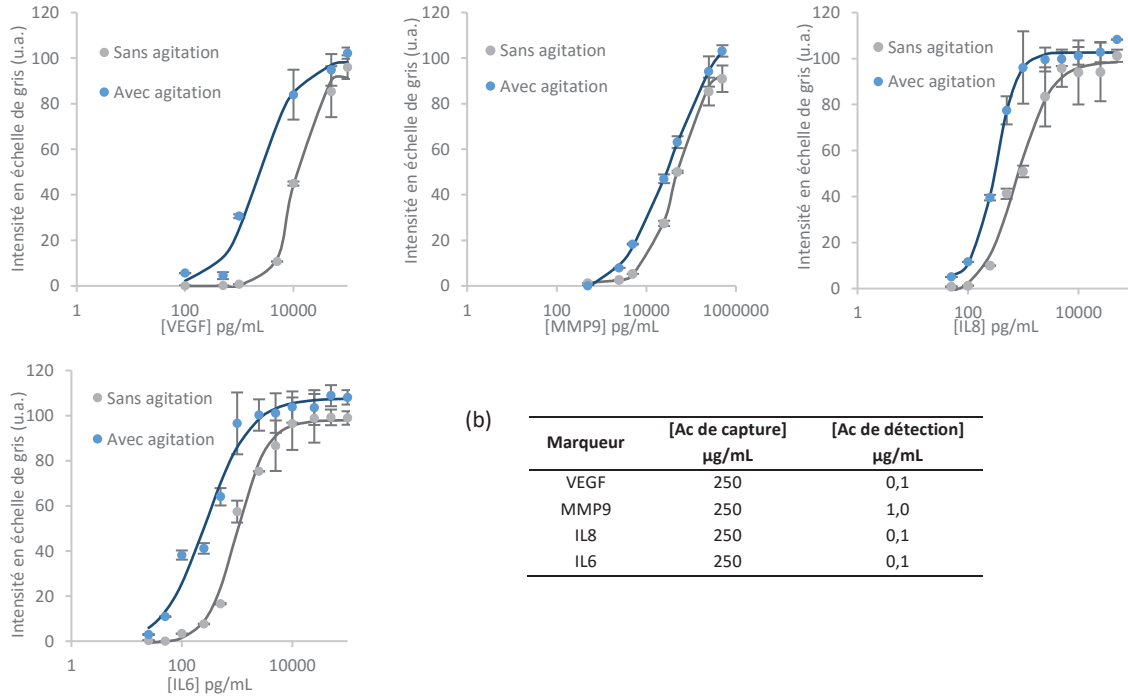
Figure 9-21. Influence du temps d'incubation des protéines et anticorps de détection sur la sensibilité des dosages. (a) Courbes d'étalonnage de VEGF, MMP9 et IL8 selon le temps d'incubation (b) Paramètres des courbes ajustées (c) Conditions de l'immunoessai. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots

La diffusion des molécules lors de l'incubation n'est pas uniquement dépendante du temps mais également de la température. Celle-ci a été définie dès le départ à 37°C. Nous n'avons pas jugé qu'il soit approprié d'augmenter la température pour améliorer la diffusion. Il existe tout de même un autre paramètre d'incubation modifiable : l'agitation. En effet, l'incubation était jusqu'à présent sans agitation. Or, l'agitation de la plaque permet un mélange des réactifs. Le format planaire de la puce à protéines étant limitant par sa surface, l'agitation est donc un bon moyen de mettre en contact de façon continue tous les réactifs avec le fond du puits où se trouvent les anticorps de capture.

Une comparaison des résultats obtenus sans agitation et avec agitation (de 450 rpm) lors de la phase d'incubation des protéines et des anticorps de détection met en avant l'amélioration de la sensibilité et des limites de détection et de quantification grâce à l'agitation (Figure 9-22).

Développement d'une plateforme d'immunoessais pour la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie

(a)



(b)

Marqueur	[Ac de capture] µg/mL	[Ac de détection] µg/mL
VEGF	250	0,1
MMP9	250	1,0
IL8	250	0,1
IL6	250	0,1

(c)

Paramètre	Incubation sans agitation				Incubation avec agitation			
	VEGF	MMP9	IL8	IL6	VEGF	MMP9	IL8	IL6
a	99,2	119	103	108	91,6	95,5	98,7	98,0
b	-1,25	-0,741	-2,29	-1,085	-2,63	-1,43	-1,39	-1,60
c	2416	38400	318	318	10280	46795	764	1001
d	0,414	-5,22	4,18	4,18	-0,056	1,24	-3,33	-0,935

Figure 9-22. Influence de l'agitation lors de la phase d'incubation des protéines et anticorps de détection sur la sensibilité des dosages. (a) Courbes d'étalonnage de VEGF, MMP9, IL8 et IL6 avec et sans agitation (à 450 rpm) (b) Conditions de l'immunoessai (c) Paramètres des courbes ajustées. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

Une nouvelle estimation des limites de détection et de quantification a alors été effectuée. On remarque une amélioration significative de ces limites. Les marqueurs VEGF et IL6 présentent les plus fortes diminutions de limites tandis qu'IL8 présente les diminutions les plus faibles mais ce dernier avait déjà des performances acceptables. La limite de quantification du dosage d'IL6 est maintenant inférieure aux concentrations déterminées dans des échantillons urinaires de patients.

Tableau 9-2. Limites de détection et de quantification de VEGF, MMP9, IL8 et IL6 après instauration de l'agitation

	VEGF	MMP9	IL8	IL6
Mesures des blancs en intensité de signal (u.a.)				
Moyenne	1,30	1,56	0,603	0,243
Écart-type	1,15	2,67	0,483	0,478
L _D	4,75	9,58	2,05	1,68
L _Q	12,8	28,3	5,44	5,02
Conversion en concentration de protéine (pg/mL)				
L _D	225	826	62	6
L _Q	553	2100	104	16
% de diminution des limites après instauration de l'agitation				
L _D	92	85	15	93
L _Q	86	82	18	90

L_D, limite de détection ; L_Q, limite de quantification

Suite à l'amélioration des performances, une nouvelle détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-MMP9 a été réalisée. En effet, cet anticorps possède la concentration d'utilisation la plus élevée (1 µg/mL) et une diminution de celle-ci permettrait de diminuer la quantité nécessaire et donc une réduction du coût. Pour cela, une gamme de concentrations a été établie selon les nouvelles conditions de l'immunoessai (notamment la phase d'incubation sous agitation). L'histogramme de la Figure 9-23 montre que l'intensité est constante de 1 à 0,5 µg/mL et commence à diminuer à partir de 0,2 µg/mL. La nouvelle concentration optimale en anticorps de détection anti-MMP9 a donc été fixée à 0,5 µg/mL. Une comparaison des résultats obtenus avec l'ancienne concentration et la concentration sélectionnée montre des courbes d'étalonnage similaires (Figure 9-23, b).

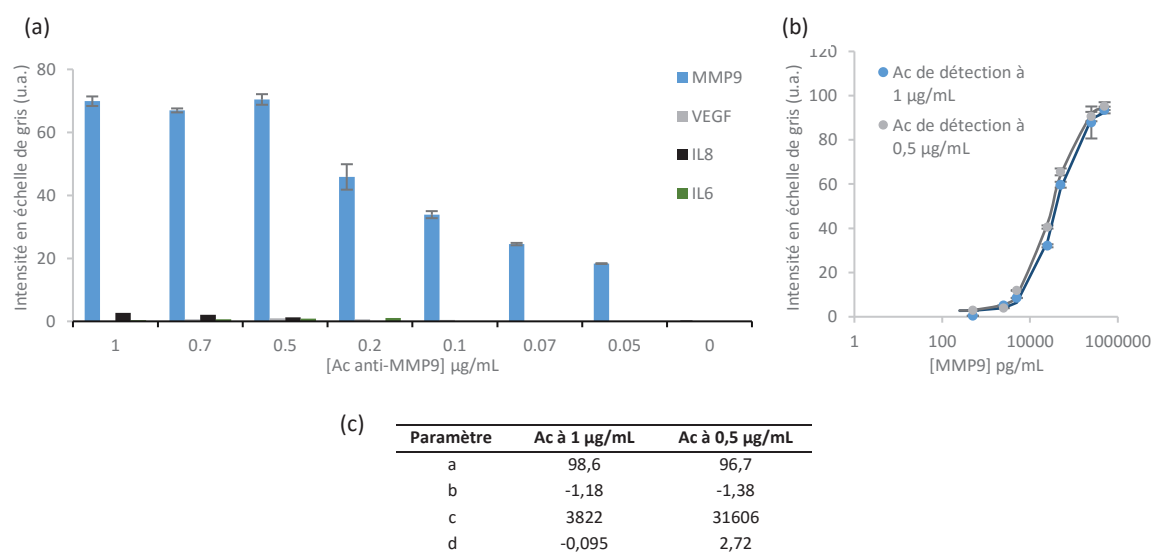


Figure 9-23. Détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-MMP9. (a) Gamme de concentrations d'anticorps de détection anti-MMP9 à une concentration de MMP9 fixe (38 000 pg/mL) (b) Courbes d'étalonnage de MMP9 à deux concentrations d'anticorps de détection anti-MMP9 différentes (c) Paramètres des courbes ajustées Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 plots.

Enfin, une dernière étape d'optimisation concerne la qualité des images des puits. En effet, malgré le lavage des puits entre chaque étape de l'immunoessai, des poussières et des fibres sont retrouvées au fond des puits à la fin du protocole. Lors de l'analyse des images, ces poussières peuvent gêner la détection des plots par le logiciel AXOware. Ce problème a été résolu par le nettoyage des puits par soufflage d'air comprimé sur la plaque en fin de protocole et avant la prise des images. La Figure 9-24 donne un exemple de qualité d'image avant et après le nettoyage.

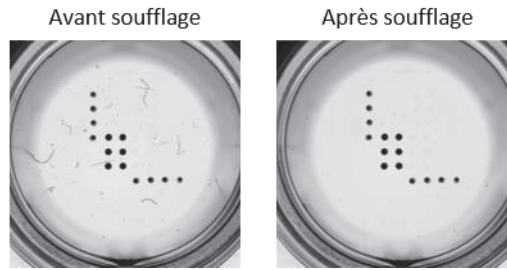


Figure 9-24. Nettoyage des puits par soufflage d'air comprimé

5.2. INTÉGRATION DES MARQUEURS CDH1 ET ERBB2

La dernière étape du développement de l'immunoessai multiparamétrique du Panel 2 est l'intégration simultanée des marqueurs CDH1 et ErbB2. Les courbes d'étalonnages obtenues pour les six marqueurs sont présentées dans la Figure 9-25 (a). Sans optimisation préalable, il a donc été possible de réaliser une courbe d'étalonnage pour les deux nouveaux marqueurs. On remarque cependant que le marqueur CDH1 présente un faible signal : à la plus haute concentration, son intensité maximale est inférieure à 20 u.a.. De plus, une réaction croisée est visible avec d'autres marqueurs du test, bien que l'intensité des signaux reste faible. Cela concerne plus particulièrement les plots d'anticorps de capture anti-IL6. Une interaction entre un des réactifs du dosage de CDH1 et les anticorps de capture anti-IL6 est donc à surveiller lors de la suite du développement de l'immunoessai multiparamétrique.

Les résultats des marqueurs VEGF, MMP9, IL8 et IL6 ont été comparés à ceux obtenus avant l'intégration de CDH1 et ErbB2. Comme le montre la Figure 9-26, les courbes des quatre marqueurs sont similaires dans les deux configurations du test.

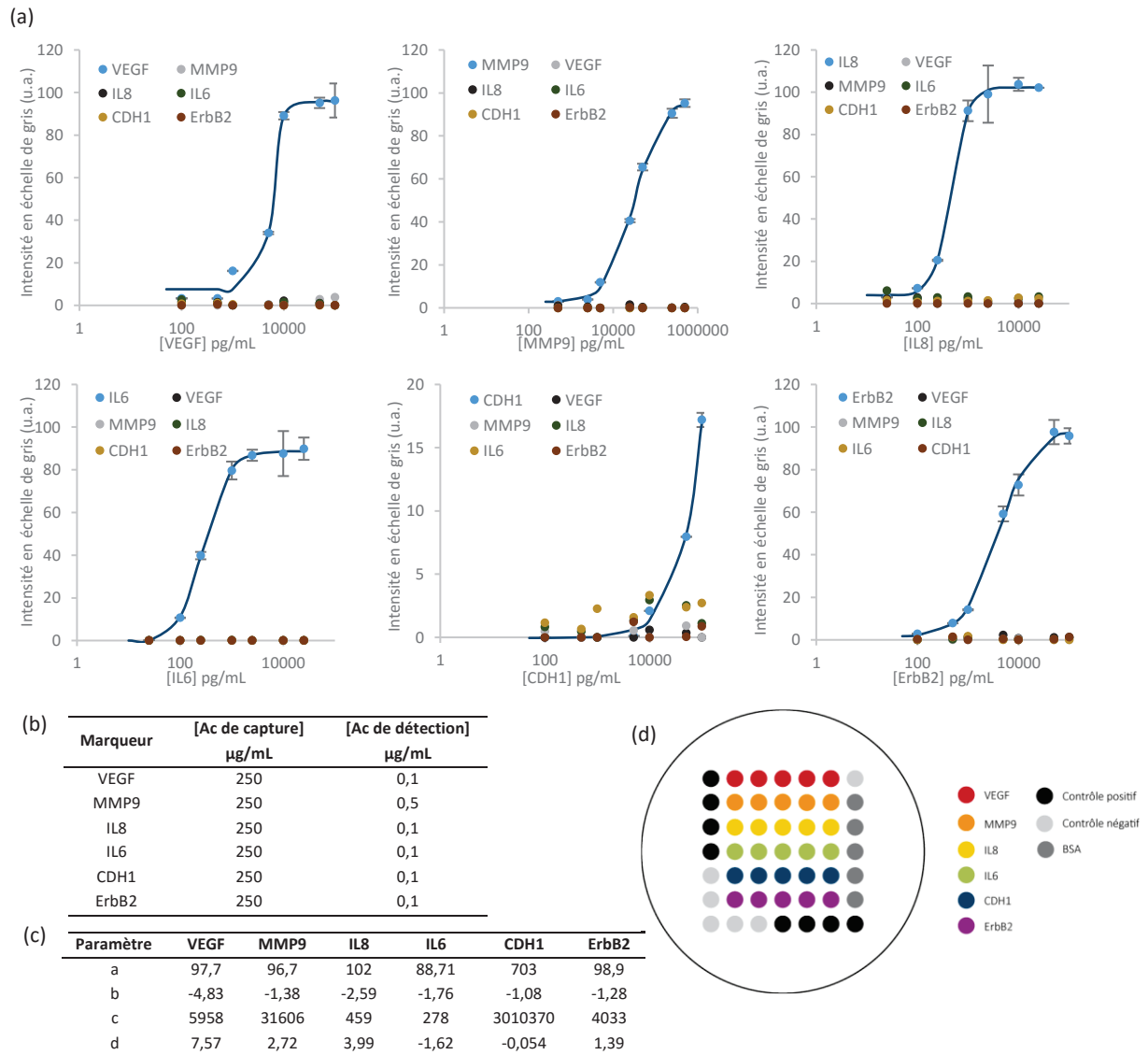


Figure 9-25. Immunoessai multiparamétrique pour la quantification de VEGF, MMP9, IL8, IL6, CDH1 et ErbB2. (a) Courbes d'étalonnage (b) Conditions de l'immunoessai (c) Paramètres des courbes ajustées (d) Matrice de plots. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 5 plots.

Développement d'une plateforme d'immunoessai pour la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie

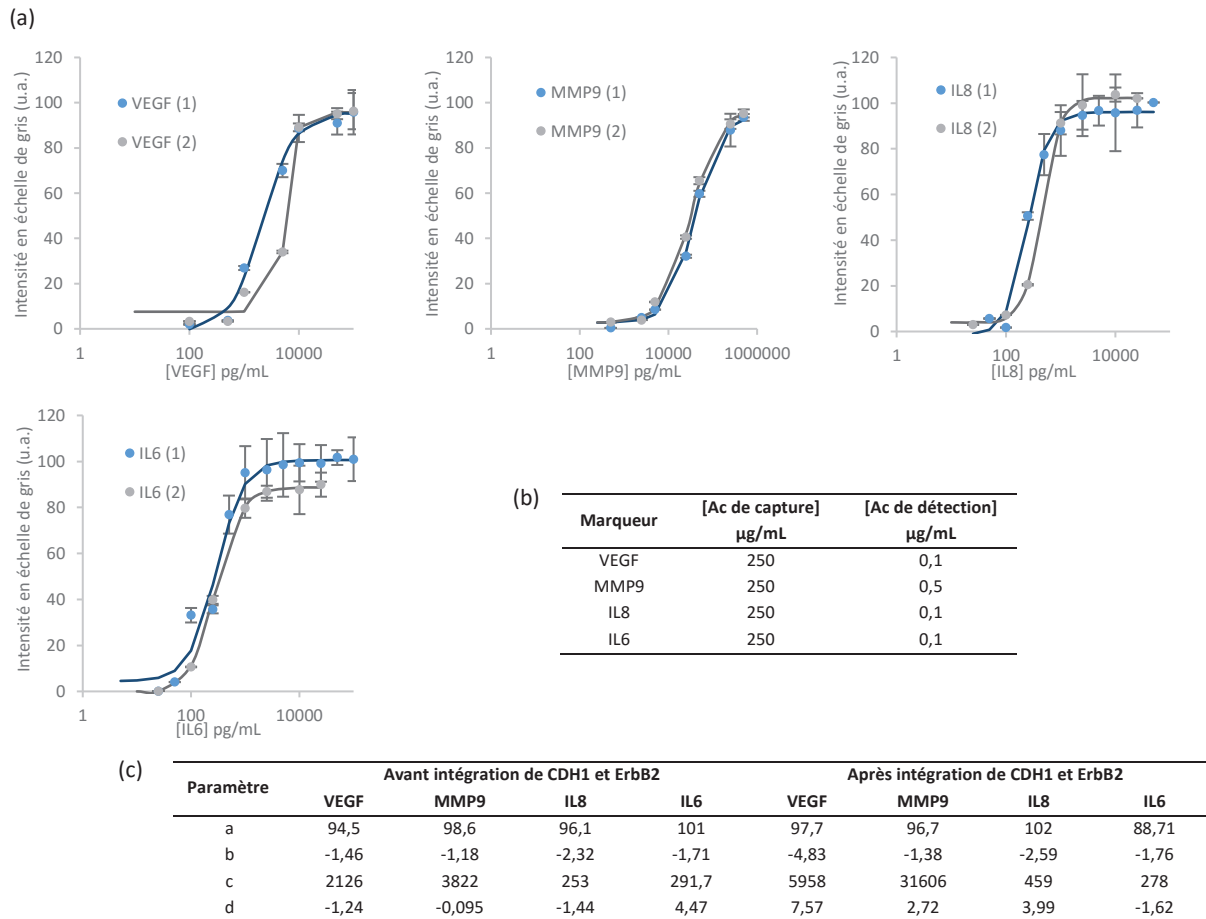


Figure 9-26. Comparaison des courbes d'étalonnage avant (1) et après (2) intégration des marqueurs CDH1 et ErbB2. (a) Courbes d'étalonnage (b) Conditions de l'immunoessai (c) Paramètres des courbes ajustées
Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 5 plots.

Une première démarche d'optimisation des dosages des deux nouveaux marqueurs intégrés est la détermination de la concentration optimale en anticorps de détection. Une gamme de concentrations pour chaque anticorps de détection a donc été réalisée (Figure 9-27). Concernant CDH1, des signaux non spécifiques apparaissent sur les plots de tous les autres anticorps de capture. Ces signaux sont les plus élevés à la plus forte concentration d'anticorps de détection anti-CDH1 et diminuent lorsque la concentration diminue. Pour tous les marqueurs sauf IL6, ils disparaissent (ou ont une intensité proche de zéro) à partir d'une concentration de 0,1 µg/mL d'anticorps de capture anti-CDH1. Les plots d'anticorps de capture anti-IL6 présentent un signal d'une forte intensité. Cette intensité est même supérieure à l'intensité du signal spécifique CDH1 pour des concentrations en anticorps de détection anti-CDH1 de 2 à 0,5 µg/mL. Sachant que ce signal diminue lorsque la concentration en anticorps diminue, il est probable qu'il s'agisse d'une réaction croisée de l'anticorps de détection anti-CDH1 avec l'anticorps de capture anti-IL6. Pour limiter cette réaction croisée, il est donc préférable d'utiliser une concentration d'anticorps inférieure ou égale à 0,1 µg/mL. Quoi qu'il en soit, une augmentation de cette concentration n'aurait pas permis d'améliorer les performances du dosage puisque l'intensité du signal correspondant à CDH1 n'est pas significativement plus élevée à des concentrations d'anticorps

supérieures à 0,1 µg/mL. Il sera donc nécessaire d'établir une autre stratégie d'amélioration des performances.

Quant au marqueur ErbB2, les intensités de signal maximales ne sont pas observées aux plus fortes concentrations d'anticorps (2 et 1 µg/mL) mais à de plus faibles concentrations (entre 0,5 et 0,07 µg/mL). L'intensité diminue ensuite entre 0,7 µg/mL et 2 µg/mL. Il peut donc s'agir d'un effet « écran » de l'anticorps de détection qui, à de fortes concentrations, empêche l'interaction de l'antigène avec l'anticorps de capture. Sa concentration optimale a donc été définie à 0,1 µg/mL (c'est la concentration utilisée initialement).

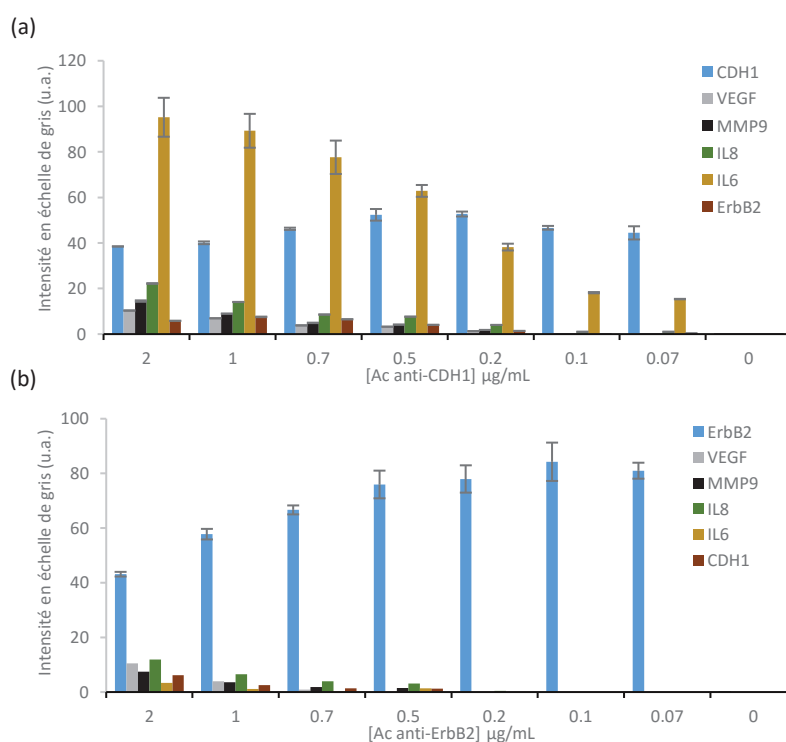


Figure 9-27. Détermination de la concentration optimale d'anticorps de détection anti-CDH1 et anti-ErbB2 (a) Gamme de concentrations d'anticorps de détection anti-CDH1 à une concentration de CDH1 fixe (50 000 pg/mL) (b) Gamme de concentrations d'anticorps de détection anti-ErbB2 à une concentration d'ErbB2 fixe (10 000 pg/mL)

5.2.1. STRATÉGIES D'OPTIMISATION DU DOSAGE DE CDH1

Les premiers tests de dosage de CDH1 n'étant pas satisfaisants et l'intensité du signal ne pouvant être améliorée par augmentation de la concentration d'anticorps de détection anti-CDH1, la pertinence du choix de la protéine de calibration a alors été investiguée. Un premier test a été effectué avec des échantillons urinaires de patients dans lesquels la protéine CDH1 avait été détectée lors des études de sélection des marqueurs. Trois échantillons (B014P, B004H et B013H) ont donc été testés. Une gamme a pu être établie à l'aide de chacun d'eux par dilution de l'échantillon initial (Figure 9-28, a). Pour deux de ces échantillons, la concentration de CDH1 était connue. Une comparaison a donc été possible avec

Développement d'une plateforme d'immunoessais pour la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie

la gamme d'étalonnage de la protéine de calibration (Figure 9-28, b). On observe très distinctement des signaux d'intensité plus élevée pour les gammes d'échantillons. Ces dernières ont de meilleures performances que la gamme de protéine de calibration. L'allure des courbes met en avant une meilleure sensibilité (pente de la courbe) ainsi qu'une meilleure limite de détection : elle se trouve entre 200 et 250 pg/mL pour les échantillons tandis qu'elle est d'environ 10 000 pg/mL pour la protéine de calibration. De plus, le signal maximal atteint une intensité de 42 u.a. et 27 u.a. pour les échantillons B013H et B004H pour une concentration de 3816 pg/mL et 3340 pg/mL alors que le signal maximal de la protéine de calibration n'est que de 18 u.a. pour une concentration plus élevée (100 000 pg/mL). Ce test permet de confirmer que l'immunoessai comprend une paire d'anticorps adéquate pour la détection de CDH1. Le manque de performances est donc dû à la protéine de calibration utilisée.

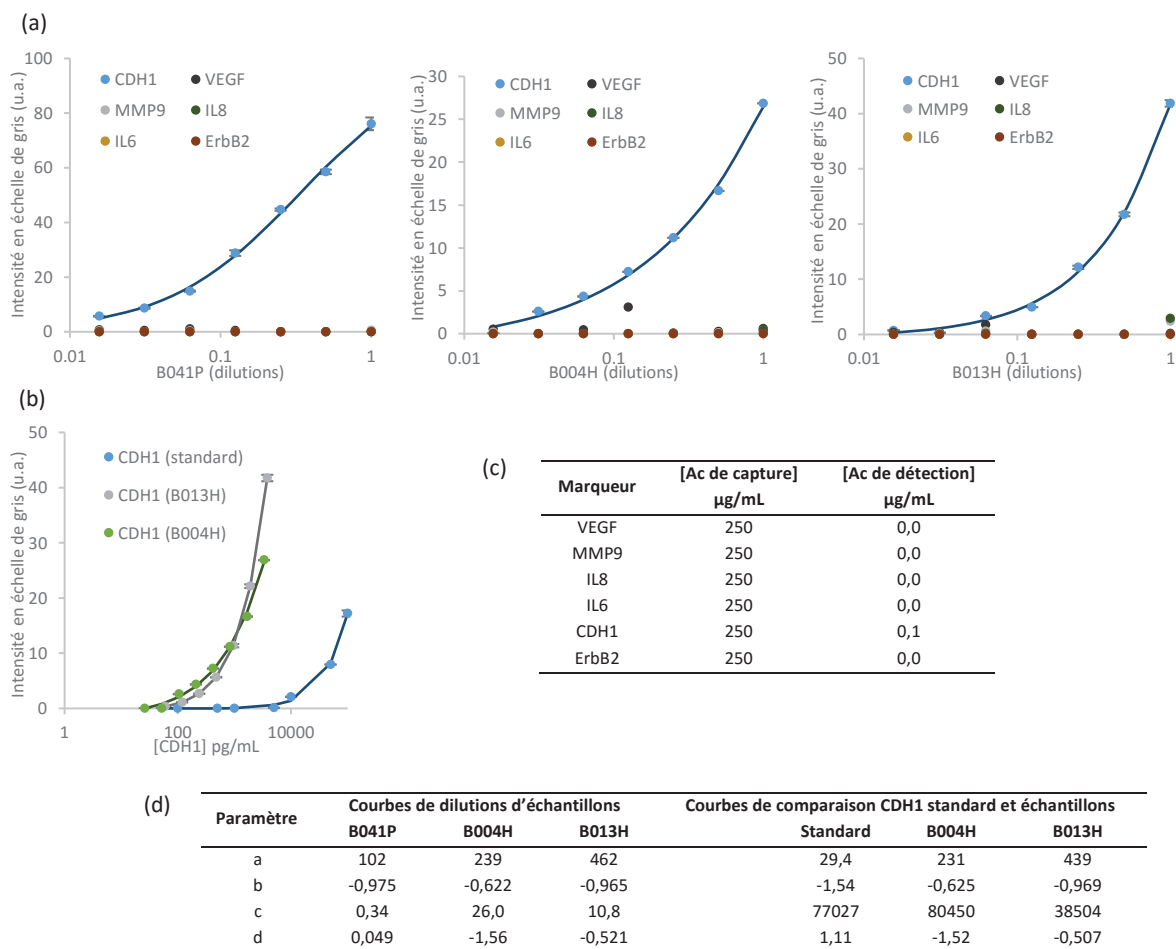


Figure 9-28. Détection de CDH1 dans des échantillons urinaires de patients (a) Courbes de dilutions de trois échantillons (b) Comparaisons des courbes d'échantillons avec la protéine de calibration (c) Conditions de l'immunoessai (d) Paramètres des courbes ajustées. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 5 plots.

Après renseignement auprès du fournisseur, la protéine de calibration actuellement disponible remplace une ancienne référence qui n'est plus commercialisée. Bien que cette dernière ait été validée avec la paire d'anticorps anti-CDH1, la référence actuelle ne l'a pas encore été. De plus, ces deux références présentent des différences structurales : l'ancienne référence correspond à une protéine de fusion recombinante composée de la protéine CDH1 recombinante humaine (acides aminés 155 à

707) liée au fragment Fc de l'IgG1 tandis que la référence actuelle correspond à la protéine CDH1 recombinante humaine (acides aminés 155 à 707).

Nous avons pu obtenir un échantillon de l'ancienne référence. Les résultats décrits dans la Figure 9-29 montrent effectivement la différence de performance du dosage selon la protéine utilisée. La limite de détection (déterminée visuellement sur les courbes) est deux fois plus basse avec l'ancienne référence (environ 5 000 pg/mL) par rapport à la référence actuelle (environ 10 000 pg/mL). La sensibilité est également améliorée et l'intensité du signal obtenu pour une concentration de 100 000 pg/mL est environ multipliée par quatre pour la référence actuelle. Ainsi, le manque de performance provient vraisemblablement de la protéine de calibration.

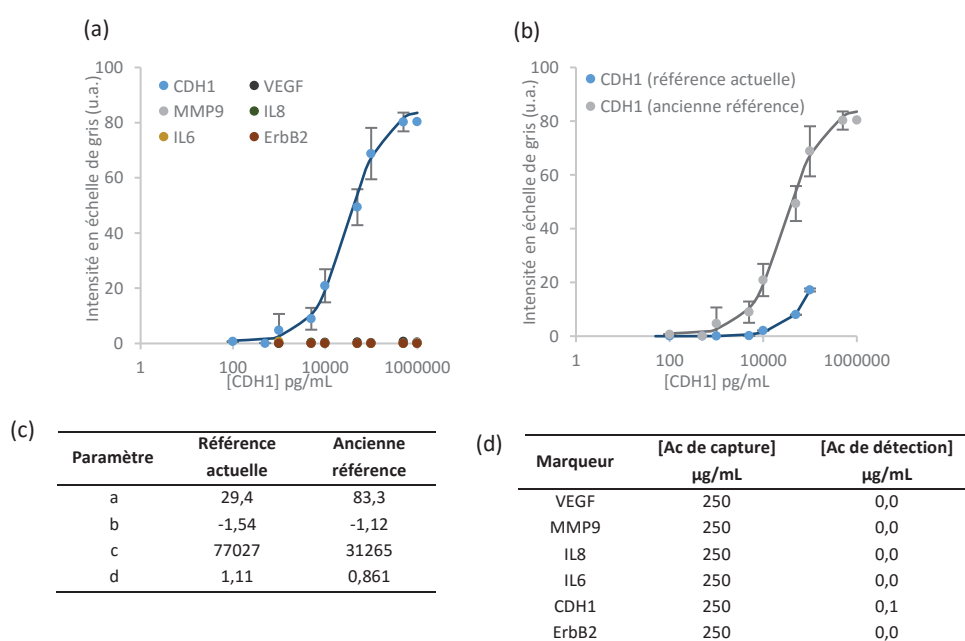


Figure 9-29. Changement de référence de la protéine de calibration CDH1. (a) Courbe d'étalonnage avec l'ancienne référence du fournisseur (b) Comparaison des courbes d'étalonnage entre la référence actuelle du fournisseur et l'ancienne référence (c) Paramètres des courbes ajustées (d) Conditions de l'immunoessai Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 5 plots.

5.2.2. CAS PARTICULIER DU MARQUEUR EN2

Le développement d'une méthode de dosage pour le marqueur EN2 s'est arrêté au début du développement de l'immunoessai multiparamétrique du Panel 1. Il avait alors été pris en charge par nos partenaires de projet de l'Austrian Institute of Technology. Contrairement à notre méthode basée sur un immunoessai monoparamétrique en mode direct, ils ont pu développer une méthode de type sandwich sur une puce à protéines. La molécule de capture n'est cette fois-ci pas un anticorps mais un aptamère ADN.

Les aptamères sont des acides nucléiques qui, grâce à leur structure tridimensionnelle, peuvent reconnaître d'autres molécules et se lier spécifiquement à une cible. Ils ont l'avantage d'être stables et facilement synthétisables ainsi que de présenter une haute spécificité (Wang *et al*, 2014). Un dosage de la protéine EN2 a récemment été développé grâce à une détection électrochimique couplée à une sonde ADN comportant la séquence spécifique. La limite de détection atteinte par cette méthode est de 5,62 fM (Lee *et al*, 2015).

Nos partenaires ont établi la preuve de concept du dosage de la protéine EN2 en utilisant un aptamère ADN immobilisé sur un support et un anticorps de détection. Cette méthode permet d'obtenir une sensibilité plus élevée ainsi qu'une gamme dynamique étendue par rapport à une méthode sandwich classique comportant un anticorps de capture. À présent, il est donc envisageable d'intégrer le marqueur EN2 sur notre plateforme et l'immunoessai multiparamétrique comprenant les autres marqueurs du Panel 2.

5.3. CONCLUSION

À l'exception du marqueur EN2, tous les marqueurs du Panel 2 ont pu être intégrés à l'immunoessai multiparamétrique. Ce dernier comprend donc VEGF, IL8, IL6, CDH1 et ErbB2 mais également MMP9 qui ne fait pas partie du Panel 2. Le développement de ce test n'est cependant pas terminé. Outre l'intégration du marqueur EN2 qui semble désormais possible, il est également nécessaire d'optimiser l'immunoessai, notamment pour le marqueur CDH1.

De plus, il est important de ne pas oublier la notion de vulnérabilité à la réaction croisée d'un immunoessai multiparamétrique de type sandwich, décrite dans le Chapitre 2 (voir la section 2.4). Sa valeur numérique correspond au nombre d'interactions possibles par paire de réactifs et augmente de façon quadratique avec le nombre de cibles. Ainsi, pour un test comprenant six marqueurs, la vulnérabilité est de 120. Si un marqueur est ajouté (tel qu'il est prévu pour EN2), la vulnérabilité serait alors augmentée pour atteindre une valeur de 168. L'évaluation des réactions croisées est donc une étape importante. Elle a pour l'instant été mise en œuvre pour trois marqueurs uniquement (VEGF, MMP9 et IL8). Les phénomènes de réaction croisée qui ont déjà pu être observés ne semblent pas empêcher une détection multiplexe des marqueurs avec des performances appropriées. Néanmoins, le marqueur CDH1 présente une réaction croisée importante avec le marqueur IL6. Son impact devra faire l'objet d'une évaluation plus poussée.

Suite à l'optimisation du test et l'évaluation des réactions croisées, une validation analytique est nécessaire. Celle-ci pourra se baser sur les guides et recommandations publiés à ce sujet et décrits

dans la section 2 du Chapitre 2. Il faudra notamment déterminer la fidélité et la justesse de notre méthode ainsi que les limites de détection et de quantification de chaque marqueur.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont porté sur le développement d'une puce à protéines pour l'analyse multiparamétrique de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie. Ils sont divisés en deux parties correspondant à la sélection des marqueurs et au développement d'une plateforme d'immunoessais multiparamétriques pour la détection et la quantification des marqueurs sélectionnés.

Dans un premier temps, la sélection de marqueurs d'intérêt a été réalisée grâce à deux études. La première, étude pilote, a permis de définir un panel de marqueurs pour le diagnostic du cancer de la vessie. Pour cela, les marqueurs à évaluer ont tout d'abord été identifiés grâce à un modèle moléculaire du cancer de la vessie créé par un des partenaires du projet (emergentec biodevelopment). Les marqueurs identifiés ont ensuite été évalués grâce à des trousse ELISA commerciales permettant leur quantification dans les échantillons urinaires. L'évaluation portait sur la mesurabilité et la détectabilité puis la sélectivité des marqueurs dans des échantillons urinaires de patients atteints de cancer de la vessie. Parmi les vingt marqueurs initiaux, seuls dix ont montré à la fois une mesurabilité dans l'urine, une détectabilité dans les échantillons de patients ainsi qu'une sélectivité pour le cancer de la vessie. Suite à l'évaluation des performances diagnostiques individuelles et en combinaison des marqueurs, cinq d'entre eux ont été sélectionnés pour former le Panel 1 : VEGF, MMP9, IL8, PTGS2 et EN2. C'est en effet une des combinaisons de marqueurs les plus performantes. De plus, il possède une performance globale supérieure au marqueur MMP9 qui présentait la meilleure performance individuelle.

Contrairement à l'étude pilote, la deuxième étude ne concerne pas le diagnostic du cancer de la vessie mais a été orientée vers sa récurrence. Plus précisément, l'objectif de la deuxième étude était d'évaluer le potentiel de marqueurs urinaires et de paramètres cliniques pour le diagnostic de la récurrence du cancer de la vessie. Cette évaluation s'est donc faite sur deux groupes de patients : des patients présentant une récurrence du cancer de la vessie et des patients suivis suite à un cancer de la vessie mais ne présentant pas de récurrence. Plusieurs modèles de régression multiple ont alors été identifiés dont le plus performant atteint une valeur d'AUC de 0,91, montrant également une meilleure performance que les paramètres individuels. Le Panel 2, basé sur ce modèle, comprend donc les paramètres cliniques et moléculaires suivants : le nombre de récurrences antérieures, le nombre de thérapies par BCG, le stade de la tumeur au moment du diagnostic, CDH1, IL8, ErbB2, IL6, EN2 et VEGF.

Dans un second temps, un test multiparamétrique pour la quantification des marqueurs sélectionnés a été développé. Il s'agit d'une plateforme automatisée, à haut-débit et sous un format de plaques de microtitration 96-puits. Plus particulièrement, la méthode choisie est un immunoessai de type sandwich. Ce dernier a été développé en format de puce à protéines grâce à l'expertise d'AXO Science. Des matrices de plots d'anticorps de capture ont été réalisées en fond de puits des plaques de microtitration grâce à un automate de dépôt. Quant à la détection de l'interaction entre les anticorps de capture, les analytes et les anticorps de détection, une méthode enzymatique et colorimétrique a été utilisée.

Le développement de cette plateforme a débuté avec le Panel 1. Trois des marqueurs (VEGF, MMP9 et IL8) ont été intégrés avec succès à l'immunoessai multiparamétrique tandis qu'il n'a pas été possible d'obtenir un immunoessai performant pour la détection de PTGS2. Enfin, le dernier marqueur du Panel 1, EN2, a fait l'objet d'un autre format d'immunoessai puis son développement a été transféré à un partenaire du projet.

La seconde étude de sélection de biomarqueurs a été réalisée en parallèle. La fin de cette étude et la définition finale du Panel 2 ont donc marqué la transition du développement de l'immunoessai multiparamétrique du Panel 1 vers le Panel 2. À l'exception du marqueur EN2, tous les marqueurs du Panel 2 ont pu être intégrés à l'immunoessai multiparamétrique. Il comprend également MMP9, marqueur non inclus dans le Panel 2. Les premières étapes d'optimisation ont permis d'obtenir des résultats satisfaisants avec une réaction croisée limitée entre les différents réactifs. Avant d'établir la validation analytique, il est toutefois nécessaire d'effectuer une optimisation plus poussée, notamment pour CDH1 et ErbB2, les derniers marqueurs à avoir été intégrés au test. Il est également envisageable d'intégrer le marqueur EN2 en format sandwich à la plateforme grâce au remplacement de l'anticorps de capture par un aptamère reconnaissant spécifiquement la protéine EN2. Enfin, une validation clinique du Panel 2 est prévue avec la plateforme analytique validée et sur un nombre d'échantillons urinaires de patients plus important (environ 150).

Le développement de la plateforme fait partie du projet européen DIPROMON. Ce dernier a pour objectif d'élaborer un nouveau concept de stratification des patients atteints de cancer de la vessie grâce à leurs profils de biomarqueurs. L'étude aboutissant au Panel 2 a évalué uniquement l'aspect diagnostique de la récurrence du cancer de la vessie. Néanmoins, les prochaines évaluations cliniques seront orientées vers la prédiction de la récurrence. Ainsi, la plateforme finalisée devrait permettre de déterminer des profils de marqueurs dans un contexte clinique et d'élaborer un ensemble de règles de prédiction de l'évolution de la pathologie, plus particulièrement de la récurrence.

Un tel outil prédictif serait bénéfique pour la prise en charge des patients atteints du cancer de la vessie. En effet, ce dernier présente un fort taux de récurrence et l'amélioration de la détermination du risque de récurrence permettrait une prise en charge optimale et personnalisée à chaque patient. Enfin, ce concept de médecine personnalisée grâce aux informations obtenues par l'analyse de plusieurs paramètres sur notre plateforme pourra être appliqué à d'autres cancers ou pathologies.

RÉFÉRENCES

Ahene AB, Morrow C, Rusnak D, Spitz S, Usansky J, Pils H, Civoli F, Pandya K, Sue B, Leach D, Derent J (2012) Ligand binding assays in the 21st century laboratory: Automation. *AAPS J* **14**: 142.

Ahram M, Petricoin EF (2008) Proteomics discovery of disease biomarkers. *Biomark Insights* **3**: 325–333.

Akbani R, Becker K-F, Carragher N, Goldstein T, Koning L de, Korf U, Liotta L, Mills GB, Nishizuka SS, Pawlak M, Petricoin EF, Pollard HB, Serrels B, Zhu J (2014) Realizing the promise of reverse phase protein arrays for clinical, translational, and basic research: A workshop report. *Mol Cell Proteomics* **13**: 1625–1643.

Albala JS, Humphery-Smith I (2003) Protein arrays, biochips and proteomics: the next phase of genomic discovery (CRC Press).

Alexandre I, Hamels S, Dufour S, Collet J, Zammattéo N, De Longueville F, Gala JL, Remacle J (2001) Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Anal Biochem* **295**: 1–8.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**: 1626–1634.

Angenendt P (2005) Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discov Today* **10**: 503–511.

Babjuk M, Kostírová M, Mudra K, Pecher S, Smolová H, Pecan L, Ibrahim Z, Dvoráček J, Jarolím L, Novák J, Zima T (2002) Qualitative and quantitative detection of urinary human complement factor H-related protein (BTA stat and BTA TRAK) and fragments of cytokeratins 8, 18 (UBC rapid and UBC IRMA) as markers for transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* **41**: 34–39.

Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, Rouprêt M (2011) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol* **59**: 997–1008.

Barratt J, Topham P (2007) Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *CMAJ Can Med Assoc J* **177**: 361–368.

Billerey C, Sibony M, Gattegno B, Chopin D (2001) Anatomie pathologique des tumeurs superficielles de la vessie. *Prog En Urol* **11**: 805–863.

Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff A-S, Bossard N (2013) Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 – Tumeurs solides (Institut de veille sanitaire).

Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* **56**: 930.

Biomarkers Definitions Working Group. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **69**: 89–95.

- Birtwell S, Morgan H (2009) Microparticle encoding technologies for high-throughput multiplexed suspension assays. *Integr Biol* **1**: 345–362.
- Bischoff R, Luider TM (2004) Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *J Chromatogr B* **803**: 27–40.
- Black PC (2016) Fine-tuning risk stratification for non–muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* **69**: 70–71.
- Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M (1996) A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* **14**: 375–388.
- Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR (2008) Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J* **2**: 212–221.
- Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y (2013) Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* **63**: 234–241.
- Busato Júnior WFS, Almeida GL, Ribas CAPM, Ribas Filho JM, De Cobelli O (2016) EORTC risk model to predict progression in patients with non–muscle-invasive bladder cancer: Is it safe to use in clinical practice? *Clin Genitourin Cancer* **14**: 176–182.
- Campos-Fernandes J-L, Descotes F, Andre J, Perrin P, Devonec M, Ruffion A (2007) Intérêt des marqueurs urinaires dans le diagnostic et le suivi des tumeurs urothéliales de vessie. *Prog En Urol* **17**: 23–34.
- Carrascosa LG, Moreno M, Alvarez M, Lechuga LM (2006) Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. *Trends Anal Chem* **25**: 196–206.
- Cheng Z-Z, Corey MJ, Pärevalo M, Majno S, Hellwage J, Zipfel PF, Kinders RJ, Raitanen M, Meri S, Jokiranta TS (2005) Complement Factor H as a marker for detection of bladder cancer. *Clin Chem* **51**: 856–863.
- Chen M-F, Lin P-Y, Wu C-F, Chen W-C, Wu C-T (2013a) IL-6 expression regulates tumorigenicity and correlates with prognosis in bladder cancer. *PLoS ONE* **8**: e61901.
- Chen PC-H, Yu H-J, Chang Y-H, Pan C-C (2013b) Her2 amplification distinguishes a subset of non-muscle-invasive bladder cancers with a high risk of progression. *J Clin Pathol* **66**: 113–119.
- Chopin D, Gattegno B (2001) Tumeurs superficielles de la vessie. *Prog Urol* **11**: 1045–1064.
- Chou R, Buckley D, Fu R, Gore JL, Gustafson K, Griffin J, Grusing S, Selph S (2015) Emerging approaches to diagnosis and treatment of non–muscle-invasive bladder cancer (Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US)).
- Chowdhury F, Williams A, Johnson P (2009) Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. *J Immunol Methods* **340**: 55–64.
- Clark PE, Agarwal N, Biagioli MC, Eisenberger MA, Greenberg RE, Herr HW, Inman BA, Kuban DA, Kuzel TM, Lele SM, Michalski J, Pagliaro LC, Pal SK, Patterson A, Plimack ER, Pohar KS, Porter MP, Richie JP, Sexton WJ, Shipley WU, Small EJ, Spiess PE, Trump DL, Wile G, Wilson TG, Dwyer M, Ho M (2013) Bladder cancer. *J Natl Compr Canc Netw* **11**: 446–475.

COFRAC (2015) SH GTA 04 - Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale. <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04> (consulté le 16/03/2016).

Compton C (2007) Getting to personalized cancer medicine. *Cancer* **110**: 1641–1643.

Cordon-Cardo C, Reuter VE, Lloyd KO, Sheinfeld J, Fair WR, Old LJ, Melamed MR (1988) Blood group-related antigens in human urothelium: enhanced expression of precursor, LeX, and LeY determinants in urothelial carcinoma. *Cancer Res* **48**: 4113–4120.

Cretich M, Damin F, Chiari M (2014) Protein microarray technology: how far off is routine diagnostics? *The Analyst* **139**: 528–542.

Crew JP (1999) Vascular Endothelial Growth Factor: An important angiogenic mediator in bladder cancer. *Eur Urol* **35**: 2–8.

Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, Harris AL (1997) Vascular Endothelial Growth Factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* **57**: 5281–5285.

Denef JF - Université Catholique de Louvain - Faculté de Médecine (2013) Le système urinaire <http://www.isto.ucl.ac.be/safe/urinair4.htm> (consulté le 08/01/2016).

Desmet C, Blum LJ, Marquette CA (2013) Multiplex microarray ELISA versus classical ELISA, a comparison study of pollutant sensing for environmental analysis. *Environ Sci Process Impacts* **15**: 1876–1882.

Desmet C, Le Goff GC, Brès J-C, Rigal D, Blum LJ, Marquette CA (2011) Multiplexed immunoassay for the rapid detection of anti-tumor-associated antigens antibodies. *The Analyst* **136**: 2918–2924.

Diamandis EP (2004) How are we going to discover new cancer biomarkers? A proteomic approach for bladder cancer. *Clin Chem* **50**: 793–795.

Diamandis M, White NMA, Yousef GM (2010) Personalized medicine: marking a new epoch in cancer patient management. *Mol Cancer Res* **8**: 1175–1187.

Ding M, Li Y, Wang H, Lv Y, Liang J, Wang J, Li C (2015) Diagnostic value of urinary microRNAs as non-invasive biomarkers for bladder cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* **8**: 15432–15440.

Donmez G, Sullu Y, Baris S, Yildiz L, Aydin O, Karagoz F, Kandemir B (2009) Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas. *Pathol - Res Pract* **205**: 854–857.

Droller MJ (2004) Urothelial Tumors (BC Decker Inc).

Durand-Viel D (2016) Règlements sur les DM : adoption possible avant l'été ? <http://www.dm-experts.fr/2016/01/reglements-sur-les-dm-adoption-possible-avant-lete/> (consulté le 28/02/2016).

Edwards NJ, Oberti M, Thangudu RR, Cai S, McGarvey PB, Jacob S, Madhavan S, Ketchum KA (2015) The CPTAC Data Portal: A resource for cancer proteomics research. *J Proteome Res* **14**: 2707–2713.

Ekins RP (1989) Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal* **7**: 155–168.

Ekins RP, Chu FW (1991) Multianalyte microspot immunoassay-microanalytical 'compact disk' of the future. *Clin Chem* **37**: 1955–1967.

Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG (2009) Measurement and quality control issues in multiplex protein assays: a case study. *Clin Chem* **55**: 1092–1099.

Ellis MJ, Gillette M, Carr SA, Paulovich AG, Smith RD, Rodland KK, Townsend RR, Kinsinger C, Mesri M, Rodriguez H, Liebler DC, on behalf of the Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) (2013) Connecting genomic alterations to cancer biology with proteomics: the NCI Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium. *Cancer Discov* **3**: 1108–1112.

EORTC (2006) EORTC Risk Tables for predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer <http://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/> (consulté le 09/01/2016).

Espina V, Mehta AI, Winters ME, Calvert V, Wulfkühle J, Petricoin EF 3rd, Liotta LA (2003) Protein microarrays: molecular profiling technologies for clinical specimens. *Proteomics* **3**: 2091–2100.

European Commission Health Research Directorate (2012) Research perspectives - biomarkers for patient stratification http://ec.europa.eu/research/health/pdf/biomarkers-for-patient-stratification_en.pdf (consulté le 11/01/2016).

European Medicines Agency (2011) Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2.

Falciani F (2007) *Microarray Technology Through Applications* (Garland Science).

Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, De Marzo AM, Hammond ME, Hayes DF, Iafrate AJ, Kelley RK, Marcucci G, Ogino S, Pao W, Sgroi DC, Birkeland ML (2011) NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw* **9 Suppl 5**: S1–S32.

Felix AS, Soliman AS, Khaled H, Zaghloul MS, Banerjee M, El-Baradie M, El-Kalawy M, Abd-Elsayed AA, Ismail K, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, Wilson ML (2008) The changing patterns of bladder cancer in Egypt over the past 26 years. *Cancer Causes Control* **19**: 421–429.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**: E359–E386.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman D, Bray F (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 <http://globocan.iarc.fr/> (consulté le 09/01/2016).

Fernandez-Gomez J, Rodríguez-Martínez JJ, Barmadah SE, García Rodríguez J, Allende DM, Jalon A, Gonzalez R, Alvarez-Múgica M (2007) Urinary CYFRA 21.1 is not a useful marker for the detection of recurrences in the follow-up of superficial bladder cancer. *Eur Urol* **51**: 1267–1274.

Fialho A, Chakrabarty A (2010) *Emerging Cancer Therapy: Microbial Approaches and Biotechnological Tools* (John Wiley & Sons).

Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, Khan MN, Bowsher RR (2000) Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal* **21**: 1249–1273.

Frangogiannis NG (2012) Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice. *Transl Res J Lab Clin Med* **159**: 197.

Frantzi M, Bhat A, Latosinska A (2014) Clinical proteomic biomarkers: relevant issues on study design & technical considerations in biomarker development. *Clin Transl Med* **3**: 1.

Freidlin B, McShane LM, Korn EL (2010) Randomized clinical trials with biomarkers: design issues. *JNCI J Natl Cancer Inst* **102**: 152–160.

Fuge O, Vasdev N, Allchorne P, Green JS (2015) Immunotherapy for bladder cancer. *Res Rep Urol* **7**: 65–79.

Gadisseeur R, Chapelle J-P, Cavalier E (2011) A new tool in the field of in-vitro diagnosis of allergy: preliminary results in the comparison of ImmunoCAP® 250 with the ImmunoCAP® ISAC. *Clin Chem Lab Med* **49**: 277–280.

Gallagher EM, O'Shea DM, Fitzpatrick P, Harrison M, Gilmartin B, Watson JA, Clarke T, Leonard MO, McGoldrick A, Meehan M, Watson C, Furlong F, O'Kelly P, Fitzpatrick JM, Dervan PA, O'Grady A, Kay EW, McCann A (2008) Recurrence of urothelial carcinoma of the bladder: a role for insulin-like growth factor-II loss of imprinting and cytoplasmic E-cadherin immunolocalization. *Clin Cancer Res* **14**: 6829–6838.

Gardiner RA, Samarasinghe MLTH, Walsh MD, Seymour GJ, Lavin MF (1992) An immunohistological demonstration of c-erbB-2 oncoprotein expression in primary urothelial bladder cancer. *Urol Res* **20**: 117–120.

Gee J, Lee I-L, Grossman HB, Sabichi AL (2008) Forced COX-2 expression induces PGE(2) and invasion in immortalized urothelial cells. *Urol Oncol* **26**: 641–645.

Gehring A, He X, Fratamico P, Lee J, Bagi L, Brewster J, Paoli G, He Y, Xie Y, Skinner C, Barnett C, Harris D (2014) A high-throughput, precipitating colorimetric sandwich ELISA microarray for Shiga toxins. *Toxins* **6**: 1855–1872.

Ghosh D, Poisson LM (2009) 'Omics' data and levels of evidence for biomarker discovery. *Genomics* **93**: 13–16.

Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PMM, Kurth KH (2003) Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol* **169**: 1975–1982.

Gogalic S, Sauer U, Doppler S, Preininger C (2015) Bladder cancer biomarker array to detect aberrant levels of proteins in urine. *The Analyst* **140**: 724–735.

Golijanin D, Sherman Y, Shapiro A, Pode D (1995) Detection of bladder tumors by immunostaining of the lewis x antigen in cells from voided urine. *Urology* **46**: 173–177.

Gonzalez-Gonzalez M, Jara-Acevedo R, Matarraz S, Jara-Acevedo M, Paradinas S, Sayagües JM, Orfao A, Fuentes M (2012) Nanotechniques in proteomics: Protein microarrays and novel detection platforms. *Eur J Pharm Sci* **45**: 499–506.

Gonzalez RM, Seuryck-Servoss SL, Crowley SA, Brown M, Omenn GS, Hayes DF, Zangar RC (2008) Development and validation of sandwich ELISA microarrays with minimal assay interference. *J Proteome Res* **7**: 2406–2414.

- Goodison S, Chang M, Dai Y, Urquidi V, Rosser CJ (2012) A multi-analyte assay for the non-invasive detection of bladder cancer. *PLoS ONE* **7**: e47469.
- Haab BB (2003) Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. *Proteomics* **3**: 2116–2122.
- Haab BB (2005) Antibody arrays in cancer research. *Mol Cell Proteomics* **4**: 377–383.
- Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA (1989) Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* **74**: 1704–1710.
- Hall DA, Ptacek J, Snyder M (2007) Protein microarray technology. *Mech Ageing Dev* **128**: 161–167.
- Hamburg MA, Collins FS (2010) The path to personalized medicine. *N Engl J Med* **363**: 301–304.
- Hamelinck D, Zhou H, Li L, Verweij C, Dillon D, Feng Z, Costa J, Haab BB (2005) Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling. *Mol Cell Proteomics MCP* **4**: 773–784.
- Hartmann M, Roeraade J, Stoll D, Templin MF, Joos TO (2009) Protein microarrays for diagnostic assays. *Anal Bioanal Chem* **393**: 1407–1416.
- HAS, INCa (2010) Guide ALD Cancer de la vessie. GUIALDVESMD10.
- Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ (1996) Tumor Marker Utility Grading System: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* **88**: 1456–1466.
- He WZ and L (2012) Multiplexed Immunoassays (Dr. Norman HL Chiu).
- Heyes SM, Bond MJ, Harrington A, Belan I (2015) The relative contributions of function, perceived psychological burden and partner support to cognitive distress in bladder cancer. *Psychooncology*.
- Hill HM (2000) Bioanalytical methods validation: A critique of the proposed FDA guidance. *Chromatographia* **52**: S65–S69.
- Hou M, Xu D, Björkholm M, Gruber A (2001) Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem* **47**: 519–524.
- Houser B (2012) Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem* **118**: 192–196.
- Hsu H-Y, Joos TO, Koga H (2009) Multiplex microsphere-based flow cytometric platforms for protein analysis and their application in clinical proteomics – from assays to results. *Electrophoresis* **30**: 4008–4019.
- Hu C-J, Song G, Huang W, Liu G-Z, Deng C-W, Zeng H-P, Wang L, Zhang F-C, Zhang X, Jeong JS, Blackshaw S, Jiang L-Z, Zhu H, Wu L, Li Y-Z (2012) Identification of new autoantigens for primary biliary cirrhosis using human proteome microarrays. *Mol Cell Proteomics MCP* **11**: 669–680.
- Ideker T, Galitski T, Hood L (2001) A new approach to decoding life: Systems Biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**: 343–372.

InfoCancer (2015a) La chimiothérapie générale <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/rein-et-voies-urinaires/cancer-vessie/traitements/la-chimiotherapie-generale.html> (consulté le 26/01/2016).

InfoCancer (2015b) Les différents stades tumeurs de la vessie <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/rein-et-voies-urinaires/cancer-vessie/formes-de-la-maladie/les-differents-stades.html> (consulté le 26/01/2016).

InfoCancer (2015c) Les formes histologiques tumeurs de la vessie <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/rein-et-voies-urinaires/cancer-vessie/formes-de-la-maladie/les-carcinomes-cellules-transitionnelles.html> (consulté le 26/01/2016).

Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-Eli M, Radinsky R, Dinney CP (2000) Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res* **60**: 2290–2299.

Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D (2002) The SELDI-TOF MS Approach to Proteomics: Protein Profiling and Biomarker Identification. *Biochem Biophys Res Commun* **292**: 587–592.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**: 69–90.

Jiang W, Wang Z, Beier RC, Jiang H, Wu Y, Shen J (2013) Simultaneous determination of 13 fluoroquinolone and 22 sulfonamide residues in milk by a dual-colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Chem* **85**: 1995–1999.

Joos TO, Stoll D, Templin MF (2002) Miniaturised multiplexed immunoassays. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 76–80.

Jordan CE, Frutos AG, Thiel AJ, Corn RM (1997) Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. *Anal Chem* **69**: 4939–4947.

Jun B-H, Kang H, Lee Y-S, Jeong DH (2012) Fluorescence-based multiplex protein detection using optically encoded microbeads. *Molecules* **17**: 2474–2490.

Juncker D, Bergeron S, Laforte V, Li H (2014) Cross-reactivity in antibody microarrays and multiplexed sandwich assays: shedding light on the dark side of multiplexing. *Curr Opin Chem Biol* **18**: 29–37.

Kader AK, Liu J, Shao L, Dinney CP, Lin J, Wang Y, Gu J, Grossman HB, Wu X (2007) Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with bladder cancer invasiveness. *Clin Cancer Res* **13**: 2614–2620.

Kahn P (1995) From genome to proteome: looking at a cell's proteins. *Science* **270**: 369–370.

Kamat AM, Briggman J, Urbauer DL, Svatek R, Nogueras González GM, Anderson R, Grossman HB, Prat F, Dinney CP (2016) Cytokine Panel for Response to Intravesical Therapy (CyPRIT): Nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol* **69**: 197–200.

Kan CW, Rivnak AJ, Campbell TG, Piech T, Rissin DM, Mösl M, Peterça A, Niederberger H-P, Minnehan KA, Patel PP, Ferrell EP, Meyer RE, Chang L, Wilson DH, Fournier DR, Duffy DC (2012) Isolation and

detection of single molecules on paramagnetic beads using sequential fluid flows in microfabricated polymer array assemblies. *Lab Chip* **12**: 977–985.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au H-J, Langer C, Moore MJ, Zalberg JR (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* **359**: 1757–1765.

Kelloff GJ, Sigman CC (2012) Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient. *Nat Rev Drug Discov* **11**: 201–214.

Kersten B, Wanker EE, Hoheisel JD, Angenendt P (2005) Multiplex approaches in protein microarray technology. *Expert Rev Proteomics* **2**: 499–510.

Kinders R, Jones T, Root R, Bruce C, Murchison H, Corey M, Williams L, Enfield D, Hass GM (1998) Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin Cancer Res* **4**: 2511–2520.

Kingsmore SF (2006) Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 310–320.

Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, Mishina M, Itoh N, Yamada H, Terachi T, Yoshida O (1997) Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* **89**: 724–730.

Kluth LA, Black PC, Bochner BH, Catto J, Lerner SP, Stenzl A, Sylvester R, Vickers AJ, Xylinas E, Shariat SF (2015) Prognostic and prediction tools in bladder cancer: a comprehensive review of the literature. *Eur Urol* **68**: 238–253.

Konety BR, Nguyen T-ST, Dhir R, Day RS, Becich MJ, Stadler WM, Getzenberg RH (2000) Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. *Clin Cancer Res* **6**: 2618–2625.

Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD, Downes M, Gudas LJ, Mongan NP, Persson JL (2013) Expression of VEGF and its receptors VEGFR1/VEGFR2 is associated with invasiveness of bladder cancer. *Anticancer Res* **33**: 2381–2390.

Kricka LJ, Master SR (2009) Quality control and protein microarrays. *Clin Chem* **55**: 1053–1055.

Krüger S, Weitsch G, Büttner H, Matthiensen A, Böhmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Böhle A (2002) HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: Prognostic implications. *Int J Cancer* **102**: 514–518.

Kulasingam V, Diamandis EP (2008) Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* **5**: 588–599.

Ladd J, Lu H, Taylor AD, Goodell V, Disis ML, Jiang S (2009) Direct detection of carcinoembryonic antigen autoantibodies in clinical human serum samples using a surface plasmon resonance sensor. *Colloids Surf B Biointerfaces* **70**: 1–6.

Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S, Keller S, Weinryb I, Green M, Duan L, Rogers JA, Millham R, O'Brien PJ, Sailstad J, Khan M, Ray C, Wagner JA (2006) Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res* **23**: 312–328.

Lee JW, Weiner RS, Sailstad JM, Bowsher RR, Knuth DW, O'Brien PJ, Fourcroy JL, Dixit R, Pandite L, Pietrusko RG, Soares HD, Quarmby V, Vesterqvist OL, Potter DM, Witliff JL, Fritche HA, O'Leary T, Perlee L, Kadam S, Wagner JA (2005) Method validation and measurement of biomarkers in nonclinical and clinical samples in drug development: a conference report. *Pharm Res* **22**: 499–511.

Lee S, Jo H, Her J, Lee HY, Ban C (2015) Ultrasensitive electrochemical detection of engrailed-2 based on homeodomain-specific DNA probe recognition for the diagnosis of prostate cancer. *Biosens Bioelectron* **66**: 32–38.

Le Goff GC, Brès J-C, Rigal D, Blum LJ, Marquette CA (2010a) Robust, high-throughput solution for blood group genotyping. *Anal Chem* **82**: 6185–6192.

Le Goff GC, Desmet C, Brès J-C, Rigal D, Blum LJ, Marquette CA (2010b) Multipurpose high-throughput filtering microarrays (HiFi) for DNA and protein assays. *Biosens Bioelectron* **26**: 1142–1151.

Lehmann S, Roche S, Allory Y, Barthelaix A, Beaudeau J-L, Berger F, Betsou F, Borg J, Dupuy A, Garin J, Quillard M, Lizard G, Peoc'h K, Riviere M, Ducoroy P (2009) Recommendations préanalytiques pour les analyses de protéomique clinique des fluides biologiques. *Ann Biol Clin (Paris)* **67**: 629–639.

Liang R-Q, Tan C-Y, Ruan K-C (2004) Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement. *J Immunol Methods* **285**: 157–163.

Li D, Ying Y, Wu J, Niessner R, Knopp D (2013) Comparison of monomeric and polymeric horseradish peroxidase as labels in competitive ELISA for small molecule detection. *Microchim Acta* **180**: 711–717.

Li H, Bergeron S, Juncker D (2012) Microarray-to-microarray transfer of reagents by snapping of two chips for cross-reactivity-free multiplex immunoassays. *Anal Chem* **84**: 4776–4783.

Lima L, Dinis-Ribeiro M, Longatto-Filho A, Santos L (2012) Predictive biomarkers of bacillus calmette-guérin immunotherapy response in bladder cancer: Where are we now? *Adv Urol* **2012**: 232609.

Liotta LA, Espina V, Mehta AI, Calvert V, Rosenblatt K, Geho D, Munson PJ, Young L, Wulfkuhle J, Petricoin EF 3rd (2003) Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell* **3**: 317–325.

Liotta LA, Petricoin EF (2008) Putting the 'bio' back into biomarkers: orienting proteomic discovery toward biology and away from the measurement platform. *Clin Chem* **54**: 3–5.

Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* **19**: 225–232.

Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Lokeshwar BL (2005a) HYAL1 Hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res* **65**: 2243.

Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet III GP, Bono AV, Getzenberg RH, Goebell P, Schmitz-Dräger BJ, Schalken JA, Fradet Y, Marberger M, Messing E, Droller MJ (2005b) Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* **66**: 35–63.

Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan RC, Soloway MS, Block NL (2000) Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol* **163**: 348–356.

Long JD, Sullivan TB, Humphrey J, Logvinenko T, Summerhayes KA, Kozinn S, Harty N, Summerhayes IC, Libertino JA, Holway AH, Rieger-Christ KM (2015) A non-invasive miRNA based assay to detect bladder cancer in cell-free urine. *Am J Transl Res* **7**: 2500–2509.

Lundberg M, Thorsen SB, Assarsson E, Villablanca A, Tran B, Gee N, Knowles M, Nielsen BS, González Couto E, Martin R, Nilsson O, Fermer C, Schlingemann J, Christensen IJ, Nielsen H-J, Ekström B, Andersson C, Gustafsson M, Brunner N, Stenvang J, Fredriksson S (2011) Multiplexed homogeneous proximity ligation assays for high-throughput protein biomarker research in serological material. *Mol Cell Proteomics MCP* **10**: M110.004978.

MacBeath G (2002) Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* **32 Suppl**: 526–532.

Mahnken A, Kausch I, Feller AC, Krüger S (2005) E-cadherin immunoreactivity correlates with recurrence and progression of minimally invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Oncol Rep* **14**: 1065–1070.

MAQC Consortium (2010) The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. *Nat Biotechnol* **28**: 827–838.

Margulis V, Shariat SF, Ashfaq R, Thompson M, Sagalowsky AI, Hsieh J-T, Lotan Y (2007) Expression of cyclooxygenase-2 in normal urothelium, and superficial and advanced transitional cell carcinoma of bladder. *J Urol* **177**: 1163–1168.

Marquette CA, Hezard P, Degiuli A, Blum LJ (2006) Macro-molecular chemiluminescent complex for enhanced immuno-detection onto microtiter plate and protein biochip. *Sens Actuators B Chem* **113**: 664–670.

Master SR, Bierl C, Kricka LJ (2006) Diagnostic challenges for multiplexed protein microarrays. *Drug Discov Today* **11**: 1007–1011.

McDermott JE, Wang J, Mitchell H, Webb-Robertson B-J, Hafen R, Ramey J, Rodland KD (2013) Challenges in biomarker discovery: combining expert insights with statistical analysis of complex omics data. *Expert Opin Med Diagn* **7**: 37–51.

McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM (2005) Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* **97**: 1180–1184.

Mertens LS, Neuzillet Y, Horenblas S, van Rhijn BWG (2013) Biomarkers for assessing therapeutic response in bladder cancer. *Arch Esp Urol* **66**: 495–504.

Mian C, Lodde M, Haitel A, Egarter Vigl E, Marberger M, Pycha A (2000a) Comparison of two qualitative assays, the UBC rapid test and the BTA stat test, in the diagnosis of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* **56**: 228–231.

Mian C, Lodde M, Haitel A, Vigl EE, Marberger M, Pycha A (2000b) Comparison of the monoclonal UBC-ELISA test and the NMP22 ELISA test for the detection of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* **55**: 223–226.

Michaud GA, Salcius M, Zhou F, Bangham R, Bonin J, Guo H, Snyder M, Predki PF, Schweitzer BI (2003) Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol* **21**: 1509–1512.

- Miller JC, Zhou H, Kwekel J, Cavallo R, Burke J, Butler EB, Teh BS, Haab BB (2003) Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* **3**: 56–63.
- Montironi R, Lopez-Beltran A (2005) The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol* **13**: 143–153.
- Moore CD, Ajala OZ, Zhu H (2016) Applications in high-content functional protein microarrays. *Curr Opin Chem Biol* **30**: 21–27.
- Morales A, Eiding D, Bruce AW (1976) Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* **116**: 180–183.
- Morgan R, Bryan RT, Javed S, Launchbury F, Zeegers MP, Cheng KK, James ND, Wallace DMA, Hurst CD, Ward DG, Knowles MA, Pandha H (2013) Expression of Engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker. *Eur J Cancer* **49**: 2214–2222.
- Mortuaire G, Marchetti P, Formstecher P, Danzé P-M (2004) Nouvelle approche globale en protéomique : les biopuces à protéines. Techniques actuelles et applications. *Ann Biol Clin (Paris)* **62**: 139–148.
- Moussa O, Abol-Enein H, Bissada NK, Keane T, Ghoneim MA, Watson DK (2006) Evaluation of survivin reverse transcriptase-polymerase chain reaction for noninvasive detection of bladder cancer. *J Urol* **175**: 2312–2316.
- Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, Schubert J, Melle C, Junker K (2005) ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol* **47**: 885–894.
- Nakanishi R, Oka N, Nakatsuji H, Koizumi T, Sakaki M, Takahashi M, Fukumori T, Kanayama H (2009) Effect of vascular endothelial growth factor and its receptor inhibitor on proliferation and invasion in bladder cancer. *Urol Int* **83**: 98–106.
- National Comprehensive Cancer Network (2015) NCCN Clinical Practice Guidelines Bladder Cancer (Version 2.2015) http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site (consulté le 22/01/2016).
- Nedelkov D, Nelson RW (2003a) Delineating protein-protein interactions via biomolecular interaction analysis-mass spectrometry. *J Mol Recognit JMR* **16**: 9–14.
- Nedelkov D, Nelson RW (2003b) Design and use of multi-affinity surfaces in biomolecular interaction analysis-mass spectrometry (BIA/MS): a step toward the design of SPR/MS arrays. *J Mol Recognit JMR* **16**: 15–19.
- Neely LA, Patel S, Garver J, Gallo M, Hackett M, McLaughlin S, Nadel M, Harris J, Gullans S, Rooke J (2006) A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression. *Nat Methods* **3**: 41–46.
- Newman RH, Hu J, Rho H-S, Xie Z, Woodard C, Neiswinger J, Cooper C, Shirley M, Clark HM, Hu S, Hwang W, Jeong JS, Wu G, Lin J, Gao X, Ni Q, Goel R, Xia S, Ji H, Dalby KN, Birnbaum MJ, Cole PA, Knapp S, Ryazanov AG, Zack DJ, Blackshaw S, Pawson T, Gingras A-C, Desiderio S, Pandey A, Turk BE, Zhang J, Zhu H, Qian J (2013) Construction of human activity-based phosphorylation networks. *Mol Syst Biol* **9**: 655.

- Nikapota AD, Cresswell J, Appleyard S, Catt SL (2016) Quality of life after bladder cancer: A prospective study comparing patient-related outcomes after radical surgery or radical radiotherapy for bladder cancer. *Clin Oncol* **28**: 373-375.
- Nishizuka SS, Mills GB (2015) New era of integrated cancer biomarker discovery using reverse-phase protein arrays. *Drug Metab Pharmacokinet* **31**: 35-45.
- Nossier AI, Eissa S, Ismail MF, Hamdy MA, Azzazy HME-S (2014) Direct detection of hyaluronidase in urine using cationic gold nanoparticles: A potential diagnostic test for bladder cancer. *Biosens Bioelectron* **54**: 7–14.
- van Oostrum J, Calonder C, Rechsteiner D, Ehrat M, Mestan J, Fabbro D, Voshol H (2009) Tracing pathway activities with kinase inhibitors and reverse phase protein arrays. *Proteomics – Clin Appl* **3**: 412–422.
- Ostendorff HP, Awad A, Braunschweiger KI, Liu Z, Wan Z, Rothschild KJ, Lim MJ (2013) Multiplexed VeraCode bead-based serological immunoassay for colorectal cancer. *J Immunol Methods* **400–401**: 58–69.
- Parker J, Spiess PE (2011) Current and emerging bladder cancer urinary biomarkers. *Sci World J* **11**: 1103–1112.
- Park JW, Kerbel RS, Kelloff GJ, Barrett JC, Chabner BA, Parkinson DR, Peck J, Ruddon RW, Sigman CC, Slamon DJ (2004) Rationale for biomarkers and surrogate end points in mechanism-driven oncology drug development. *Clin Cancer Res* **10**: 3885–3896.
- Pei J, Lou Y, Zhong R, Han B (2014) MMP9 activation triggered by epidermal growth factor induced FoxO1 nuclear exclusion in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* **35**: 6673–6678.
- Pfister C, Roupret M, Neuzillet Y, Larré S, Pignot G, Quintens H, Houédé N, Compérat E, Colin P, Roy C, Davin J-L, Guy L, Irani J, Lebret T, Coloby P, Soulié M (2013) Recommandations en onco-urologie 2013 du CCAFU : Tumeurs de la vessie. *Prog En Urol* **23, Supplement 2**: S105–S125.
- Pla-Roca M, Leulmi RF, Tourekhanova S, Bergeron S, Laforte V, Moreau E, Gosline SJC, Bertos N, Hallett M, Park M, Juncker D (2012) Antibody colocalization microarray: a scalable technology for multiplex protein analysis in complex samples. *Mol Cell Proteomics* **11**: M111.011460.
- Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA (2009) The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* **27**: 289–293.
- Poetz O, Henzler T, Hartmann M, Kazmaier C, Templin MF, Herget T, Joos TO (2010) Sequential multiplex analyte capturing for phosphoprotein profiling. *Mol Cell Proteomics* **9**: 2474–2481.
- Poste G (2011) Bring on the biomarkers. *Nature* **469**: 156–157.
- Ramachandran N, Srivastava S, LaBaer J (2008) Applications of protein microarrays for biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl* **2**: 1444–1459.
- Rao RS, Visuri SR, McBride MT, Albala JS, Matthews DL, Coleman MA (2004) Comparison of multiplexed techniques for detection of bacterial and viral proteins. *J Proteome Res* **3**: 736–742.

Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, Devanarayan V, Willey MB, Brandt JT, Dean RA (2005) Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *J Pharm Biomed Anal* **36**: 1037–1044.

Reddy G, Dalmaso EA (2003) SELDI ProteinChip® Array Technology: protein-based predictive medicine and drug discovery applications. *J Biomed Biotechnol* **2003**: 237–241.

Reis ST, Leite KRM, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI, Abe DK, Crippa A, Moura CM, Adonias SP, Srougi M, Dall'Oglio MF (2012) Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of bladder cancer. *BMC Urol* **12**: 18.

van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH (2005) Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* **47**: 736–748.

Rifai N, Gillette MA, Carr SA (2006) Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* **24**: 971–983.

Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, Piech T, Patel PP, Chang L, Rivnak AJ, Ferrell EP, Randall JD, Provuncher GK, Walt DR, Duffy DC (2010) Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol* **28**: 595–599.

Rivnak AJ, Rissin DM, Kan CW, Song L, Fishburn MW, Piech T, Campbell TG, DuPont DR, Gardel M, Sullivan S, Pink BA, Cabrera CG, Fournier DR, Duffy DC (2015) A fully-automated, six-plex single molecule immunoassay for measuring cytokines in blood. *J Immunol Methods* **424**: 20–27.

Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, Müller M (2013) PanelomiX: A threshold-based algorithm to create panels of biomarkers. *Transl Proteomics* **1**: 57–64.

Roda A, Pasini P, Guardigli M, Baraldini M, Musiani M, Mirasoli M (2000) Bio- and chemiluminescence in bioanalysis. *Fresenius J Anal Chem* **366**: 752–759.

Röglin L (2013) Bits and Beads: Analyzing bead based immunoassays using the KNIME Image Processing Nodes. Présentation au 6th KNIME User Group Meeting and Workshops (Zurich, Switzerland). http://www.knime.org/files/ugm2013_talks/20130307_-_roeglin_knime_ugm_2013_final.pdf (consulté le 12/04/2016).

Romanov V, Davidoff SN, Miles AR, Grainger DW, Gale BK, Brooks BD (2014) A critical comparison of protein microarray fabrication technologies. *Analyst* **139**: 1303–1326.

Rongen H a. H, Hoetelmans RMW, Bult A, Bennekom WPV (1994) Chemiluminescence and immunoassays. *J Pharm Biomed Anal* **12**: 433–462.

Rosser CJ, Chang M, Dai Y, Ross S, Mengual L, Alcaraz A, Goodison S (2014a) Urinary protein biomarker panel for the detection of recurrent bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **23**: 1340–1345.

Rosser CJ, Dai Y, Miyake M, Zhang G, Goodison S (2014b) Simultaneous multi-analyte urinary protein assay for bladder cancer detection. *BMC Biotechnol* **14**: 24.

Rosser CJ, Ross S, Chang M, Dai Y, Mengual L, Zhang G, Kim J, Urquidi V, Alcaraz A, Goodison S (2013) Multiplex protein signature for the detection of bladder cancer in voided urine samples. *J Urol* **190**: 2257–2262.

Rouleau A, EL Osta M, Lucchi G, Ducoroy P, Boireau W (2012) Immuno-MALDI-MS in human plasma and on-chip biomarker characterizations at the femtomole level. *Sensors* **12**: 15119-15132.

Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM (2012) Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem Rev* **112**: 2739–2779.

Sánchez-Carbayo M, Espasa A, Chinchilla V, Herrero E, Megías J, Mira A, Soria F (1999) New electrochemiluminescent immunoassay for the determination of CYFRA 21-1: analytical evaluation and clinical diagnostic performance in urine samples of patients with bladder cancer. *Clin Chem* **45**: 1944–1953.

Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Haab BB, Cordon-Cardo C (2006) Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *Am J Pathol* **168**: 93–103.

Sang-Hoon Cho JJ (2012) Personalized medicine in breast cancer: a systematic review. *J Breast Cancer* **15**: 265–272.

Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L (2005) Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *J Clin Oncol* **23**: 2020–2027.

Schroeder GL, Lorenzo-Gomez M-F, Hautmann SH, Friedrich MG, Ekici S, Huland H, Lokeshwar V (2004) A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. *J Urol* **172**: 1123–1126.

Schrohl A-S, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J, Brünner N, European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Receptor and Biomarker Group (2003) Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics* **2**: 378–387.

Schweitzer B, Predki P, Snyder M (2003) Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale. *Proteomics* **3**: 2190–2199.

Schweitzer B, Roberts S, Grimwade B, Shao W, Wang M, Fu Q, Shu Q, Laroche I, Zhou Z, Tchernev VT, Christiansen J, Velleca M, Kingsmore SF (2002) Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. *Nat Biotechnol* **20**: 359–365.

Schweitzer B, Wiltshire S, Lambert J, O'Malley S, Kukanskis K, Zhu Z, Kingsmore SF, Lizardi PM, Ward DC (2000) Immunoassays with rolling circle DNA amplification: A versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10113–10119.

Seripa D, Parrella P, Gallucci M, Gravina C, Papa S, Fortunato P, Alcini A, Flammia G, Lazzari M, Fazio VM (2001) Sensitive detection of transitional cell carcinoma of the bladder by microsatellite analysis of cells exfoliated in urine. *Int J Cancer J Int Cancer* **95**: 364–369.

Shah VP (2007) The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. *AAPS J* **9**: E43–E47.

Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y (2007) Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* **109**: 1106–1113.

Shariat SF, Casella R, Khoddami SM, Hernandez G, Sulser T, Gasser TC, Lerner SP (2004) Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer. *J Urol* **171**: 626–630.

- Shariat SF, Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI (2008) Critical evaluation of urinary markers for bladder cancer detection and monitoring. *Rev Urol* **10**: 120–135.
- Sharma S, Ksheersagar P, Sharma P (2009) Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am Fam Physician* **80**: 717–723.
- Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**: 787–791.
- Sheinfeld J, Reuter VE, Fair WR, Cordon-Cardo C (1992) Expression of blood group antigens in bladder cancer: current concepts. *Semin Surg Oncol* **8**: 308–315.
- Shi L (2006) 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. <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/BioinformaticsTools/MicroarrayQualityControlProject/UCM132150.pdf> (consulté le 18/02/2016).
- Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, Hennenlotter J, Kruck S, Stenzl A (2009) Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol* **27**: 295–300.
- Simon RM, Paik S, Hayes DF (2009) Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *JNCI J Natl Cancer Inst* **101**: 1446–1452.
- Spriggs FP, Zhong ZD, Safavi A, Jani D, Dontha N, Kant A, Ly J, Brilando L, Österlund K, Rouleau N, Fischer SK, Boissonneault M, Ray C (2012) Ligand binding assays in the 21st century laboratory: platforms. *AAPS J* **14**: 113–118.
- Sturgeon CM, Hoffman BR, Chan DW, Ch'ng S-L, Hammond E, Hayes DF, Liotta LA, Petricoin EF, Schmitt M, Semmes OJ, Söletormos G, Merwe E van der, Diamandis EP (2008) National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in clinical practice: quality requirements. *Clin Chem* **54**: e1–e10.
- Syahir A, Usui K, Tomizaki K, Kajikawa K, Mihara H (2015) Label and label-free detection techniques for protein microarrays. *Microarrays* **4**: 228–244.
- Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Newling DWW, Kurth K (2006) 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* **49**: 466–465; discussion 475–477.
- Szkola A, Linares EM, Worbs S, Dorner BG, Dietrich R, Märtlbauer E, Niessner R, Seidel M (2014) Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay. *The Analyst* **139**: 5885–5892.
- Taylor TP, Janech MG, Slate EH, Lewis EC, Arthur JM, Oates JC (2012) Overcoming the effects of matrix interference in the measurement of urine protein analytes. *Biomark Insights* **7**: 1–8.
- Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vöhringer CF, Joos TO (2002) Protein microarray technology. *Drug Discov Today* **7**: 815–822.
- Thiel AJ, Frutos AG, Jordan CE, Corn RM, Smith LM (1997) In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces. *Anal Chem* **69**: 4948–4956.

Thomas CE, Sexton W, Benson K, Sutphen R, Koomen J (2010) Urine collection and processing for protein biomarker discovery and quantification. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* **19**: 953–959.

Thompson M, Cheran L-E, Zhang M, Chacko M, Huo H, Sadeghi S (2005) Label-free detection of nucleic acid and protein microarrays by scanning Kelvin nanoprobe. *Biosens Bioelectron* **20**: 1471–1481.

Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC (2015) ELISA in the multiplex era; potential and pitfalls. *Proteomics Clin Appl* **9**: 406–422.

Tighe P, Negm O, Todd I, Fairclough L (2013) Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits. *Methods* **61**: 23–29.

Tiguert R, Ravery V, Gheiler EL, Grignon DJ, Gudziak MR, Wood DP, Pontes JE (1999) Les cancers primitifs à petites cellules de la vessie. *Prog En Urol* **9**: 256–260.

Trune DR, Larrain BE, Hausman FA, Kempton JB, MacArthur CJ (2011) Simultaneous measurement of multiple ear proteins with multiplex ELISA assays. *Hear Res* **275**: 1–7.

Underwood M, Bartlett J, Reeves J, Gardiner DS, Scott R, Cooke T (1995) C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res* **55**: 2422–2430.

University of Surrey Guildford (2013) Dipromon <http://www.surrey.ac.uk/dipromon/> (consulté le 24/02/2016).

Urquidi V, Kim J, Chang M, Dai Y, Rosser CJ, Goodison S (2012) CCL18 in a multiplex urine-based assay for the detection of bladder cancer. *PLoS ONE* **7**: e37797.

Valentin M-A, Ma S, Zhao A, Legay F, Avrameas A (2011) Validation of immunoassay for protein biomarkers: bioanalytical study plan implementation to support pre-clinical and clinical studies. *J Pharm Biomed Anal* **55**: 869–877.

Van Der Aa MNM, Steyerberg EW, Sen EF, Zwarthoff EC, Kirkels WJ, Van Der Kwast TH, Essink-Bot M-L (2008) Patients' perceived burden of cystoscopic and urinary surveillance of bladder cancer: a randomized comparison. *BJU Int* **101**: 1106–1110.

Van Le T-S, Miller R, Barder T, Babjuk M, Potter DM, Getzenberg RH (2005) Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology* **66**: 1256–1260.

Van Regenmortel MHV (2004) Reductionism and complexity in molecular biology. *EMBO Rep* **5**: 1016–1020.

Van Tilborg AA, Bangma CH, Zwarthoff EC (2009) Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol* **16**: 23–30.

Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr. GL (2001) Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* **158**: 1491–1502.

Vordos D, Ploussard G (2009) Cystoscopie en fluorescence pour les tumeurs superficielles de vessie : apport de l'hexaminolévulinate (Hexvix®) et du diagnostic photodynamique. *Prog En Urol - FMC* **19**: 9–14.

Vrooman OPJ, Witjes JA (2008) Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol* **53**: 909–916.

Wang D-L, Song Y-L, Zhu Z, Li X-L, Zou Y, Yang H-T, Wang J-J, Yao P-S, Pan R-J, Yang CJ, Kang D-Z (2014) Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **453**: 681–685.

Wild D (2005) *The Immunoassay Handbook* (Elsevier).

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnol Nat Publ Co* **14**: 61–65.

Wu G, Datar RH, Hansen KM, Thundat T, Cote RJ, Majumdar A (2001) Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nat Biotechnol* **19**: 856–860.

Yeung C, Dinh T, Lee J (2014) The health economics of bladder cancer: an updated review of the published literature. *Pharmacoeconomics* **32**: 1093–1104.

Yu X, Schneiderhan-Marra N, Joos TO (2010) Protein microarrays for personalized medicine. *Clin Chem* **56**: 376–387.

Yu X, Xu D, Cheng Q (2006) Label-free detection methods for protein microarrays. *Proteomics* **6**: 5493–5503.

Zangar RC, Daly DS, White AM (2006) ELISA microarray technology as a high-throughput system for cancer biomarker validation. *Expert Rev Proteomics* **3**: 37–44.

Zangar RC, Varnum SM, Bollinger N (2005) Studying cellular processes and detecting disease with protein microarrays. *Drug Metab Rev* **37**: 473–487.

Zhang W, Dahlberg JE, Tam W (2007) MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol* **171**: 728–738.

Zhao L, Sun L, Chu X (2009) Chemiluminescence immunoassay. *Trends Anal Chem* **28**: 404–415.

Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **293**: 2101–2105.

Zhu H, Snyder M (2003) Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 55–63.

Zuiverloon TCM, Nieuweboer AJM, Vékony H, Kirkels WJ, Bangma CH, Zwarthoff EC (2012) Markers predicting response to Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: A systematic review. *Eur Urol* **61**: 128–145.

Résumé Les travaux présentés dans cette thèse concernent le développement d'un outil d'analyse multiparamétrique pour la quantification de biomarqueurs urinaires du cancer de la vessie.

La première partie des travaux de recherche a pour objectif la sélection de marqueurs pour le diagnostic et la récurrence des tumeurs urothéliales. Une première étude a permis l'évaluation de la sélectivité de marqueurs candidats dans des échantillons urinaires de patients atteints de cancer de la vessie. Cinq des vingt marqueurs initiaux ont été sélectionnés pour leur performance diagnostique, définissant le Panel 1 : VEGF, MMP9, IL8, PTGS2 et EN2. Une seconde étude a été réalisée afin d'évaluer le potentiel de marqueurs et de paramètres cliniques pour le diagnostic de la récurrence des tumeurs urothéliales. Les échantillons urinaires évalués provenaient donc de patients présentant une récurrence du cancer de la vessie et de patients ne présentant pas de récurrence. Le Panel 2 a ainsi été défini, basé sur le modèle de régression multiple le plus performant. Il comprend les paramètres cliniques et moléculaires suivants : nombre de récurrences antérieures, nombre de thérapies par BCG, stade de la tumeur au moment du diagnostic, CDH1, IL8, ErbB2, IL6, EN2 et VEGF.

La seconde partie concerne le développement d'un test multiparamétrique pour la quantification des marqueurs sélectionnés. Il s'agit d'une plateforme automatisée, à haut-débit et sous un format de plaque de microtitration 96-puits. La méthode de quantification choisie est un immunoessai de type sandwich sous la forme de puce à protéines. Le développement de la plateforme a débuté avec le Panel 1 dont trois des cinq marqueurs (VEGF, MMP9 et IL8) ont été intégrés avec succès. Suite à la seconde étude de sélection de marqueurs, le développement de l'immunoessai multiparamétrique a été orienté vers le Panel 2. À l'exception du marqueur EN2, nécessitant une configuration d'immunoessai différente, tous les marqueurs du Panel 2 ont pu être intégrés à la plateforme.

Bladder cancer: selection of urinary biomarkers and development of a multiplex analytical tool for the diagnosis and recurrence of urothelial tumors

Abstract The work reported in this thesis focuses on the development of a multiplex analytical tool for the quantification of selected bladder cancer urinary biomarkers.

The aim of the first part of this work is the selection of urinary biomarkers for the diagnosis and recurrence of urothelial tumors. A first study evaluated the selectivity of candidate markers in urine samples of bladder cancer patients. Five of the twenty initial markers were selected for their diagnostic performance. They define Panel 1: VEGF, MMP9, IL8, PTGS2 and EN2. A second study was then conducted to assess the potential of urinary markers and clinical parameters for the diagnosis of bladder cancer recurrence. Two types of urine samples were thus evaluated: samples from recurrent bladder cancer patients and samples from bladder cancer patients without recurrence. Panel 2 was then defined based on the best performing multivariate regression model. It includes the following clinical and molecular parameters: number of past recurrences, number of BCG therapies, tumor stage at diagnosis, CDH1, IL8, ErbB2, IL6, EN2 and VEGF.

The second part involves the development of a multiplex test for the quantification of the selected markers. It is a high-throughput automated platform in a 96-well microtiter plate format. It was designed as a multiplex sandwich immunoassay based on a protein microarray. The platform development began with Panel 1 for which three of the five markers (VEGF, MMP9 and IL8) were successfully integrated into a multiplex immunoassay. The end of the second marker selection study marked the development transition from Panel 1 to Panel 2. With the exception of EN2, requiring a different immunoassay configuration, all the Panel 2 markers were integrated into the platform.

Discipline Biotechnologies

Mots-clés Cancer de la vessie ; Diagnostic ; Immunoessai multiparamétrique ; Marqueurs urinaires ; Plateforme automatisée ; Puce à protéines ; Récurrence

Keywords Automated platform ; Bladder cancer ; Diagnosis ; Multiplex immunoassay ; Protein microarray ; Recurrence ; Urinary markers

Laboratoire

Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires

Équipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires

UMR 5246 Université Lyon 1 / CNRS

Bâtiment CPE 43, Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex

Entreprise

AXO Science SAS

66, Bd Niels Bohr, 69100 Villeurbanne