

Sommaire de thèse

Le cancer est connu pour être lié à des mutations des gènes. Des altérations des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs ont été largement documentées dans la genèse du cancer. Au cours des 30 dernières années, il a été établi que la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale peut être considérée comme un processus en plusieurs étapes, avec de multiples mutations des cellules qui permettent de surmonter les contrôles cellulaires qui normalement préviennent les conséquences de ces mutations. Il est également bien documenté que le développement du cancer dépend de changements dans l'environnement et les interactions entre les cellules tumorales et les cellules normales (Hanahan et Weinberg, 2000). Il semble que tous les types de tumeurs, y compris la métastase, sont constitués de complexes de plusieurs types de cellules qui collaborent. Plusieurs mécanismes suppresseurs de tumeurs extrinsèques ont été rapportés pour dépister la présence de cellules anormales. Il s'agit d'un signal trophique émis dans le microenvironnement qui implique des interactions avec la matrice extracellulaire. Il existe également un contrôle des jonctions cellulaires et de la prolifération cellulaire par le biais de gènes impliqués dans le contrôle de la polarité cellulaire, afin d'éviter la progression du cycle cellulaire en présence de complexes jonctionnels dérégulés. Il existe également un mécanisme suppresseur de tumeurs impliquant le système immunitaire. Toutefois, le système immunitaire agit également en tant que promoteur de la progression tumorale (Vesely et al. 2011). Ce processus continu, où le système immunitaire à la fois une protection contre le développement de tumeurs et favorise leur excroissance est nommé immunoediting. Pendant ce processus, l'instabilité du génome des cellules tumorales conduit à la synthèse de protéines anormales, à des changements dans l'expression des protéines et des changements dans le microenvironnement tumoral. Ces modifications peuvent être reconnues par le système immunitaire comme des agents extérieurs au soi, et peuvent activer à la fois une immunité cellulaire et humorale. Les cibles de la réponse immunitaire, connues sous les noms d'antigènes associés aux tumeurs et d'anticorps associés aux tumeurs sont maintenant bien signalées comme biomarqueurs du cancer. Faciles à détecter dans le sang, avec une demi-vie de 21 jours pour les IgG1 (demi-vie supérieure à de nombreuses molécules biochimiques qui sont potentiellement des biomarqueurs du cancer), synthétisées en réponse à des quantités très faibles

d'antigènes, ces anticorps associés aux tumeurs sont très utiles en tant que marqueurs biologiques du cancer. Mais leur rôle dans la carcinogenèse n'est pas compris.

L'amélioration des technologies de protéomique avec le développement de la bioinformatique permet la découverte de nombreux anticorps associés à une tumeur particulière. De nombreux profils d'anticorps dans différents cancers sont maintenant bien documentés, avec une meilleure valeur de diagnostic qu'un seul marqueur. Néanmoins, concernant un cancer des voies biliaires, le cholangiocarcinome, il n'y a pas de profils établis, contrairement à ceux établis sur un autre cancer du foie, le carcinome hépatocellulaire. Or le cholangiocarcinome représente 15% des cancers primitifs du foie et son incidence est en augmentation dans les pays occidentaux. Dans cette étude, nous avons utilisé la protéomique comme méthode d'identification des auto-anticorps chez les patients atteints de cholangiocarcinome. Cet outil est nommé analyse du protéome sérologique ou SERPA. Après un chapitre sur le cholangiocarcinome, nous envisageons les mécanismes généraux immunologiques impliqués dans l'immunoediting de ce cancer, avec une attention particulière sur la genèse d'auto-anticorps. Dans une troisième partie, nous examinons par quelles technologies ces auto-anticorps peuvent être détectés pour le profilage des auto-anticorps associés à la tumeur. Enfin, nous envisageons la spectrométrie de masse dans sa dimension technologique, en particulier le LTQ - Orbitrap que nous avons utilisé. Pour tous les résultats que nous avons obtenus, nous proposons une combinaison pertinente d'auto-anticorps en tant que biomarqueurs potentiels et nous discutons les résultats à la lumière de la technologie en décrivant l'inconvénient de la SERPA, mais aussi avec les avantages d'autres technologies. La variabilité de la réponse immunitaire que nous avons observée et l'implication de l'auto-anticorps que nous avons signalé dans l'immunoediting font également partie de la discussion.

Treize échantillons de sérum de patients atteints de CC suivis au Centre Hépatobiliaire, Hôpital Paul Brousse, ont été analysés. Tous les patients répondaient aux critères internationaux pour le diagnostic de CC. Dix sérums regroupés à partir de volontaires sains ont été utilisés comme témoins. Les sérums de patients et les donneurs de sang ont été recueillis sur " un tube sec ", sans anticoagulant, centrifugé rapidement et le sérum a été conservé à -80°C, avec l'approbation du Comité de la Biobanque du Centre Hépatobiliaire, géré par le Centre de ressources biologiques

CRB Paris - Sud. Tous les sujets ont signé un consentement éclairé pour cette étude analytique.

Des échantillons de tissus du foie

Les tissus de CC et les tissus hépatiques adjacents non tumoraux utilisés pour cette étude ont été recueillis auprès de cinq patients atteints de CC qui avaient été traités chirurgicalement dans notre centre. Après la résection, les échantillons ont été rincés et refroidis dans la glace dans une solution saline normale et stockés à -80°C. Les tissus nécrotiques ont été exclus, et l'examen pathologique par un expert (CG) des tissus hépatiques non tumoraux a confirmé qu'ils ne contenaient pas de tumeur. L'utilisation de ces tissus humains était conforme aux lignes directrices fixées par le comité d'éthique local. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé pour la collecte des échantillons de sang et de tissus. Des échantillons de tissu hépatique normal ont été obtenus à partir de patients qui avaient été transplantés car ils étaient atteints de neuropathie amyloïde. Tous les tissus du foie ont été homogénéisés avec 10 mM de Tris, 50 mM de saccharose, 1 mM d'EDTA et 1 mM de fluorure de phénylméthyl sulphonide (PMSF) en utilisant un appareil Potter-Elvehjem. Les homogénats ont été lysés dans du tampon tris à 50 mM (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 1 % de triton (v / v) , SDS 0,2% (p / v) et 1% (v / v).

Les lignées cellulaires

Deux lignées cellulaires de cholangiocarcinome humain, CCSW1 et CCLP1, ont été obtenus à partir de la culture cellulaire de la Banque européenne, et les cellules ont été cultivées dans un milieu Eagle modifié Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10 % (v / v) de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur, un % (v / v) d'acides aminés non essentiels, 1 mmol / L de sodium 2- oxopropanoate, et des concentrations standards de pénicilline ainsi que de streptomycine. Les protéines cellulaires totales ont été extraites à partir des lignées cellulaires. La lyse des cellules a été effectuée avec 20 mM de tris (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 1 % de NP40 (v / v), inhibiteur de protéase 1X et de l'inhibiteur de phosphatase1X.

Électrophorèse sur gel en deux dimensions (2 -DE) et immunoblot

Les protéines provenant des homogénats lysés et des lignées cellulaires ont été précipitées en utilisant la 2 -D Clean up kit et la concentration finale en protéine a été mesurée avec le kit 2 -D Quant. Des échantillons de protéines de 250 µg pour un immunotransfert à venir, ou 1 mg pour une future coloration au bleu de Coomassie, ont été mélangés avec le tampon IEF (7,5 M d'urée, 2,2 M thiourée, 4 % (p / v) de CHAPS, 0,6 % (v / v) et immobilisés en gradient de pH (IPG) à pH 3-10, 0,8 % (v / v) dans une Destreak ® solution G d'orange. Les protéines ont ensuite été appliquées à un Immobiline bande Dry ® (gamme de pH 3-10, 13 cm). Après réhydratation pendant une nuit à température ambiante, la procédure IEF a été réalisée en appliquant une tension qui a été progressivement augmentée jusqu'à un maximum 23000V/h.

Chaque bande IPG a ensuite été équilibrée avec une solution contenant de l'urée 6 M, 0,075 M de tris (pH 8,8), 30 % (v / v) de glycérol, 2% (p / v) de SDS, 2% (p / v) et de DTT pyronine pendant 15 minutes. Les bandes ont été équilibrées à nouveau par le remplacement du DTT à 5% (p / v) idoacetamide, pendant encore 15 minutes. Les bandes IPG ont été appliquées à 10 % SDS- PAGE pour la deuxième séparation des protéines de dimension. L'analyse a été réalisée en triplicat. Après immuno-standard, les sérums de CC ont été comparés avec des sérums normaux en utilisant la numérisation et la superposition à l'aide du logiciel Adobe Photoshop ®. Les spots d'intérêt ont été définis comme ceux qui n'ont pas été souillés par les serums de CC. Les gels colorés à l'argent et leurs immunoblottings correspondants ont également été analysés, et après analyse avec le logiciel Adobe Photoshop ®, les points d'intérêt ont été localisés sur les gels. Les spots immunoréactifs obtenus avec au moins 30% de CC sérums ont ensuite été identifiés en utilisant la SP.

Procédures pour les protéines et la préparation de peptide.

Les points d'intérêt ont été excisés manuellement. La réduction de la cystéine a été effectuée avec 10 mmol / L - DTT 100 mmol / L de NH₄HCO₃ pendant 45 min. A 56 ° C, l'alkylation des protéines a été réalisée avec 55 mmol / L - iodoacétamide 100

mmol / L de NH_4HCO_3 pendant 20-30 min. Dans l'obscurité à la température ambiante, les morceaux de gel étant lavé successivement avec 100 mmol / L de NH_4HCO_3 , un mélange 1:1 (en volume) de 100 mmol / L de NH_4HCO_3 et l'acétonitrile, et de l'acétonitrile, avant d'être séchés à nouveau. Les morceaux de gel ont alors été réhydratés pendant 45 minutes à 4 ° C dans un tampon de digestion contenant 50 mmol / L de NH_4HCO_3 , 5 mmol / L de CaCl_2 , et 12,5 mg / L de la trypsine. Les peptides générés par digestion protéolytique ont été extraits par incubation dans de l'acide formique à 10 g / l pendant 15 minutes, ce qui a été suivi successivement par deux extractions avec 10 g / L d'acide formique et d'acétonitrile (1:1 en volume) et de l'ACN. Les peptides extraits ont été rassemblés et séchés dans une centrifugeuse speedvac avant de la spectrométrie de masse (MS) analyse.

Analyse par spectrométrie de masse

Les mesures LC -MS ont été obtenues en utilisant un système de nano- LC (Ultimate 3000 ; Dionex) couplée en ligne à un piège à ions linéaire hybride / Orbitrap[®] MS (LTQ OrbitrapVelos ; Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne). Un microlitre de protéines de digestion a été injecté dans le système LC nano , qui contenait une colonne C18 de piège (PepMap C18 , 300 $\mu\text{mID} \times 5 \text{ mm}$, taille 5 μm de particules et 100 une taille de pores ; Dionex) et une colonne analytique de 15 cm de long (Acclaim de pepmap SRB 75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$, nanoViper C18 , 2 μm , 100 Å) . Les peptides ont été séparés selon le gradient suivant : 100 % de solvant A (acide formique à 0,1 % dans l'eau pendant 3 min 0-55 % de solvant B (80 % d'acétonitrile dans de l'eau avec 0,1% d'acide formique) pendant 25 min, 50 à 90 % de solvant B pendant 1 min et 90 % de solvant B pendant 5 minutes. Une analyse complète haute résolution MS a été obtenue à partir de l'Orbitrap[®] (résolution 30000 ; AGC 1000000), et les spectres MS / MS ont été obtenus par fragmentation CID (dissociation induite par collision), avec une fenêtre d'isolement de 3 Da. Un dépendant des données top 5 (un plein MS et 5 MS / MS) a été obtenu avec l'option dynamique d'exclusion allumé. Les points qui étaient réactifs avec moins de 30 % des sérums n'ont pas été identifiés.

L'analyse des données

Les données ont été analysées par le logiciel Discoverer protéome 1.4. La base de données est un être humain (Swiss-Prot), l'erreur de masse pour les ions précurseurs (plein MS) est inférieure à 10 ppm ($\text{errorppm} = (m / z_{\text{experimental}} - m / z_{\text{exact}}) \times 10^6 / m / z$) à partir des spectres MS / MS qui est rapporté au moins à 0,6 Da. La masse des peptides est recherchée entre 350 Da et 5000 Da avec une rétention de temps de 10 min à 50 min. Un site de clivage de coup manqué est toléré. La modification dynamique a été activé en vue d' Nter acétylation, d'oxydation de méthionine et l'histidine, de carbamido-méthylation des acides aminés, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. La modification statique des carbamido-méthyles de la cystéine a été activée. Les identifications peptidiques ont été validées par la détermination de faux positifs par cible leurre PSM validateur. Il est grand si le taux de faux positifs (FDR ou faux taux de Discovery) est inférieur à 1 % , et le plus bas si le FDR est supérieur à 5 % de la moyenne (moyenne entre 1 et 5%) . Les identifications de peptides xcorr ont été calculées par la corrélation de spectre expérimental MS / MS par rapport à la quantité théorique du spectre MS / MS généré par le logiciel du protéome Découvreur 1,4.

Discussion :

Nous avons trouvé une réaction immunitaire généralisée et avons fait une classification de l'ontologie génétique. L'identification soulève quelques questions importantes.

1. Variabilité de la réponse immunitaire

Cette variabilité concerne la variabilité interindividuelle de la réponse immunitaire et les différences de motifs immunoréactifs selon les antigènes utilisés pour un sérum donné. La discussion dans l'article est largement développée, mais certains points ont besoin de plus d'explications. Les auto-anticorps reflètent la composition génétique ou protéine modifiée. Les AAb sont la conséquence d' épitope modifié.

L'hétérogénéité cellulaire du cancer explique que le patient développe certains AAb en réponse à ses protéines altérées ou surexprimés et développe d'autres AAb en réponse à d'autres protéines anormales. En raison de l'instabilité du génome, la CCLP1 et la lignée cellulaire de CCSW1 exposent un profil différent d'expression de protéines, comme le montrent les différences dans la résolution de la protéine 2D (figure 2 et figure 3 supplémentaires dans l'article). En outre, lorsque nous avons utilisé le foie, nous avons utilisé un mélange de plusieurs types cellulaires, et dans le foie normal, les cholangiocytes ne représentent que 1,5% du nombre total de cellules. Ces différences dans l'expression des protéines en combinaison avec le modèle individuel des AAb générés peuvent expliquer l'hétérogénéité des immunoréactivités que nous avons constatée. Cela a déjà été rapporté. Par exemple, les 16 protéines immunoréactives de HepG2 .2.15 et des lignées de cellules HepG2 issus de patients souffrant d'un carcinome hépatocellulaire rapporté par Lan Li (Li et al. 2,008) étaient différentes des quatre protéines immunoréactives obtenues à partir de foie tumoral rapportés par Takashima (Takashima et al. 2006) . La classification de l'ontologie des gènes que nous avons réalisé reflète ces différences. Par exemple, on constate un gradient décroissant de pourcentage pour les protéines immunoréactives avec l'activité structurelle (figure 1 dans l'article) , à partir de lignées cellulaires de foie normal , et un gradient croissant de protéines ayant une activité catalytique. La partie tumorale de CC que nous avons utilisée, comprend un certain pourcentage d'hépatocytes. Le grand intérêt de cette étude réside dans l'utilisation de différents substrats antigéniques offrant un extrait antigénique plus approprié que celui qui donne le plus haut pourcentage d'immunoréactivité.

2 . Autoanticorps comme biomarqueurs de cholangiocarcinome

Selon l'Institut national du cancer, un biomarqueur est " une molécule biologique trouvée dans le sang, d'autres liquides corporels ou des tissus et qui est le signe d'un processus normal ou anormal, ou d'une condition ou d'une maladie ". Il existe plusieurs utilisations potentielles des biomarqueurs du cancer : l'estimation du risque de développer un cancer, le dépistage, le diagnostic différentiel, la détermination du pronostic de la maladie, la prédiction de la réponse au traitement, la surveillance de la récurrence de la maladie et de la réponse ou de la progression de la

maladie métastatique (Henry et Hayes 2012). Avec la population que nous avons utilisée, seuls les trois premiers éléments peuvent être concevables. D'autre part, les biomarqueurs du cancer doivent avoir la meilleure sensibilité et spécificité possibles. Nous avons signalé et discuté dans l'article, le fait que certains AAb que nous avons trouvé étaient également présents dans des conditions auto-immunes, ou présents dans différents types de cancers. Par exemple, dans notre étude, la serotransferrine et l'actine du substrat antigénique approprié réagissent avec 100 % des sérums testés. Mais la vimentine comme auto-antigène commun dans les maladies auto-immunes, et la serotransferrine ont également été signalées comme cible d'anticorps dans le carcinome hépatocellulaire. Il y a une raison, selon certains rapports, pour que la combinaison de certains auto-anticorps que nous avons proposé en tant que biomarqueurs soient testés sur le meilleur substrat approprié donnant la plus grande réactivité, avec un nombre significatif de patients. L'objectif est de construire courbe ROC (ROC) conduisant à la définition de la combinaison idéale est de donner la plus grande surface sous la courbe (AUC). L'utilisation de l'algorithme de pondération sur le coefficient de régression logistique des anticorps comme marqueurs indépendants permet de calculer l'AUC (Lu et al. 2008). Mais la nécessité de l'ingénierie bio-informatique est nécessaire en raison du nombre importants de combinaisons possibles.

3 . Autoanticorps pour conduire une action efficace contre le cholangiocarcinome

La voie de la destruction des cellules de la tumeur est classiquement dévolue à l'immunité cellulaire. Mais, il a été rapporté que les cellules tumorales autologues peuvent être tués in vitro lors de l'ajout de sérum de patients atteints de cancer dans le milieu de culture (Wood et al. 1979). En outre, le transfert d'anticorps provenant d'une souris préalablement immunisée avec des tumeurs fournit une protection efficace contre une provocation tumorale chez les souris receveuses (Brown et al. 2001). Les voies de mise à mort de cellules tumorales médiée par les AAb est la cytotoxicité dépendante du complément, et l'opsonisation si le récepteur Fc est présent sur la surface de la cellule du macrophage ou d'une cellule dendritique

conduisant à la transformation et la présentation. L'AAb peut être impliqué dans l'immunité cellulaire uniquement si leurs antigènes sont accessibles, exprimés sur la face extracellulaire de la membrane plasmique. Certains antigènes que nous avons trouvé comme cibles des AAb dans le cholangiocarcinome ont été signalés comme étant exprimé sur la membrane plasmique. C'est le cas pour la cible ATPase des lymphocytes T gamma-delta (Mookerjee - Basu et al . 2010) , mais aussi, pour certains autres. HSP60 , alpha émolase , annexine A2 , fructose biphosphate aldolase A, glycérol 3-phosphate déshydrogénase , ont été rapportés comme présentes sur la membrane plasmique (Cappello et al 2008; Lopez- Villar et al 2006;. Sostaric et al 2006). Fait intéressant, l'émolase alpha se trouve à la surface de cellules de la lignée cellulaire de cancer du sein (Seweryn et al. 2009). HSP- 60 est particulièrement abondant sur la surface cellulaire des cellules cancéreuses (Shin et al. 2003) . En outre, certaines de ces protéines semblent impliquées dans le développement et l'invasivité du cancer. L' ATPase F1 est rapporté comme contribuant à générer un micro-environnement acide dans le tissu tumoral (Kawai et al. 2013) et l'alpha émolase peut agir comme récepteur pour le plasminogène (Seweryn et al. 2009) . Par ses propriétés de neutralisation, l'AAb pourrait agir comme inhibiteur de l'invasion du cancer. Ces considérations ouvrent des perspectives sur l'élaboration anticancéreuses.

Dans cette étude, l'utilisation de l'analyse du protéome sérologique nous conduit à proposer certaines molécules comme biomarqueurs potentiels pour le diagnostic de CC, un cancer dû à des cellules épithéliales, et dont la fréquence est en augmentation. Les protéines provenant de plusieurs origines ont été séparées par électrophorèse 2D : des lignées de cellules tumorales et CCSW1 CCLP1, cinq échantillons différents d'hépatectomies pour CC comparés à leurs homologues non tumoraux et à un foie normal atteint de neuropathie amyloïde. Les sérums de 13 patients atteints de CC et ceux de 10 sujets normaux ont été sondés sur immunoblot réalisé après ces différentes séparations. La comparaison des profils d'immunotransfert des sérums des patients par rapport aux modèles donnés permet d'identifier des spots immunoréactifs d'intérêt. Plus d'un tiers des AAb des sérums ont été identifiés par spectrométrie de masse de type Orbitrap. De cette manière, nous avons observé 172 points immunoréactifs d'intérêt dans la lignée cellulaire CCSW1, 189 dans la lignée cellulaire CCLP1, 39 dans l'extrait antigénique de la

tumeur, 127 dans la partie non - tumeur et 270 dans foie normal. Les spots ciblés par plus d'un tiers des sérums ont conduit à identifier 10 protéines à partir de CCSW1, 11 à partir de la lignée cellulaire CCLP1, 9 à partir d'une partie de la tumeur , 14 homologue à la partie non -tumorale et 16 à partir du foie normal. Certains étaient communs, mais néanmoins, les résultats sont très différents selon les sérums sur le même extrait antigénique, et pour un même sérum, conforme à l'extrait antigénique. Cette généralisation de la réactivité est souvent signalée dans ce type d'étude. Il apparaît qu'un seul AAb est capable d'identifier seulement une petite proportion de patients. Pour cette raison, plusieurs anticorps, en combinaison doivent être utilisés pour assurer la sensibilité et la spécificité des dosages utilisés dans la clinique quotidienne. Conformément à plusieurs auteurs, nous avons trouvé une augmentation globale de l'immunoréactivité dans les sérums du cancer par rapport aux sérums sains. Mais les protéines immunitaires ciblées en CC sont également connues pour avoir une réactivité accrue dans des maladies autres que le cancer, en particulier dans les maladies auto-immunes, comme discuté dans l'article. Cet article montre l'importance de la combinaison des différentes Ag pour obtenir un ensemble de biomarqueurs avec suffisamment de spécificité et de sensibilité pour les considérer comme une signature d'anticorps dans le CC. Mais comment choisir la bonne combinaison donnant la plus grande spécificité et de la sensibilité? En fait, cette question soulève plusieurs autres questions. Quelle source d'antigène doit être utilisée? Quelle technique? Quelles sont les méthodes statistiques adéquates qui devraient être utilisées pour définir la meilleure signature? Il existe principalement deux origines possibles: les protéines antigènes recombinantes à partir des banques d'expression d'ADNc et des protéines natives à partir de lysats de cellules. L'intérêt de cette dernière est d'accéder à des protéines avec leur niveau d'expression et leurs modifications post-traductionnelles telles qu'elles sont dans la cellule cancéreuse, en ce qui concerne les éventuelles modifications post-traductionnelles de la cellule cancéreuse. Nous utilisons dans cette étude la technologie SERPA, et une des étapes très limitatives est l'électrophorèse 2D. On ne sépare pas la protéine avec un poids moléculaire inférieur à 10 kDa ou supérieur à 100 kDa , avec un pH inférieur à 3 ou supérieur à 10. Une électrophorèse 2D de bonne qualité sépare environ 5000 protéines. Par comparaison, une lignée de cellules a 10000 gènes. La séparation des protéines de faible abondance est un problème et il y a un biais dû aux protéines de forte

abondance. En outre, dans la première dimension, l'IEF ne permet pas la séparation de puits de protéines hydrophobes ou membranaires. Au moins en raison de la limitation de la résolution, un endroit choisi à partir d'un gel 2D peut contenir plusieurs protéines avec différentes concentrations. À l'étape de l'identification, seule la banque de données permet à une protéine d'être validée si elle est préalablement déposée dans ces banques de données. Au regard de notre étude, l'amélioration principale que nous pouvons faire est d'améliorer l'homogénéat, par exemple grâce à des fractionnements par centrifugations. D'autres techniques utilisant des antigènes directement à partir de lysats de cellules tumorales, soit la 2D LC puces à protéines ou la capture d'anticorps permettent de détecter les AAbs qui se lient à un épitope natif, contrairement à l'électrophorèse 2D où la structure native des épitopes est détruite par la forte concentration de l'urée utilisée dans la première dimension et le SDS de détergents ioniques utilisés dans la seconde. Néanmoins, dans le sens inverse de capture anticorps par microarray, les anticorps pertinents utilisés pour cibler la protéine spécifique du cancer avant de sonder avec le lysat de tumeur doivent être bien définis pour couvrir le maximum. Mais dans ce cas, l'étape de détection a besoin des micro-réseaux. De nombreux rapports présentent la technologie micro-réseau de protéines comme une technique très prometteuse. Mais il y a aussi des pièges. Les techniques à haut débit, y compris aussi le fractionnement 2DLC, nécessitent une expertise importante, une importante plate-forme, et sont très coûteuses. En outre, et sans doute la difficulté la plus importante aujourd'hui est la complexité de l'immobilisation de protéines dont la compréhension exige plus d'efforts à l'avenir. Par exemple, la stratégie d'immobilisation de protéines utilise soit la fonction NH₂-terminale, ou de la fonction COOH-terminal, ou la cystéine, ou la fonction NH₂ de la chaîne latérale de la lysine. Les supports de verre avec de l'aldéhyde, l'ester actif, les fonctions époxy peuvent être utilisés (Boutheina Cherif, Des puces à protéines / peptides verser des applications en recherche Fondamentales et Cliniques Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier - Grenoble1, 2006; Graziella El Khoury, Tests immunologiques miniaturiser pour le Développement de Puces à peptides et à Protéines, Thèse de doctorat, Ecole Centrale de Lyon, 2008). La chimie qui est pratique pour une protéine, et permet une orientation optimale qui favorise l'interaction des protéines ne doit pas être pratique pour une autre protéine. La fixation de la protéine est

maintenant un boulon de la technologie largement.

En ce qui concerne les technologies utilisant comme antigènes les protéines recombinantes, le SEREX utilisé comme candidat antigènes d'une banque d'expression d'ADNc. Si les clones d'expression d'ADNc sont les produits de gènes exprimés dans des bactéries, ils ne présentent pas de modifications post-traductionnelles, au contraire des méthodes utilisant des lysats cellulaires. Ces modifications sont connues pour être importantes dans la production, dans la cellule tumorale de néo- antigènes non - reconnus étagère. Une alternative est d'utiliser le vecteur d'expression eucaryote, mais il est rapporté que la machinerie de modification post-traductionnelle ne correspond pas exactement avec celle des mammifères. Par ailleurs, l'instabilité du génome de la tumeur aboutit à une hétérogénéité de l'expression génique en ce qui concerne les différents types de cellules dans le tissu tumoral. La banque d'ADNc dérivée d'un patient n'est pas représentative des protéines modifiées et potentiellement non reconnu en tant que protéines du plateau par le système immunologique. Il ne permet pas d'identifier tous les anticorps anti- tumoraux générés.

D'autres techniques utilisant des bibliothèques d'expression d'ADNc de cellules, c'est à dire , l'affichage de la bibliothèque de phages , des puces à protéines recombinantes ont besoin pour la détection d'un réseau de protéines , avec l'inconvénient mentionné précédemment.

En raison de ces considérations, les techniques SERPA que nous utilisons est encore , une technologie pertinente , et permet de définir le substrat donnant la réactivité la plus élevée en terme de sensibilité .

Maintenant, concernant les choix de combinaison pertinente de AAb que nous proposons comme potentiellement biomarqueurs , il est nécessaire de trouver des méthodes adéquates statistiques pour définir la signature avec la meilleure sensibilité et spécificité . On a besoin d'une population plus importante que celle que nous avons utilisée. Cela doit également un support statistique fort pour trouver le modèle le plus pertinent. Un rapport sur le cancer colorectal (Leidinger et al . 2008) a utilisé un classificateur bayésien naïf pour obtenir le résultat optimal . Le plus utilisé des algorithmes basés sur la chaîne Markow ou techniques de Monte -Carlo doit être discuté ; l'utilisation de la régression logistique et courbe ROC ont été utilisés (Babel

et al . 2009) . Une étroite collaboration avec le statisticien est nécessaire .

L'étape finale serait la validation de la signature du CC par les AAb sur des cohortes multicentriques avec également une autre technique appropriée facile à utiliser dans le contexte clinique, comme l'ELISA .