



► Des progrès significatifs ont été réalisés ces dernières années en oncologie avec l'avènement de thérapeutiques nouvelles, en particulier de thérapeutiques ciblées, et de techniques d'imagerie médicale très performantes. La précocité du diagnostic et l'évaluation rapide et précise de la réponse sont essentiels à la réussite du traitement. Ces deux critères nécessitent l'identification de marqueurs de la maladie, en particulier de marqueurs biologiques, qui soient à la fois sensibles, faciles d'accès et fiables. La diffusion rapide des nouvelles technologies de protéomique applicables à l'étude des liquides biologiques d'origine humaine a suscité l'espoir d'identifier rapidement de tels marqueurs.

C'est pour faire le point de l'apport que représentent ces nouvelles technologies mais aussi de leurs contraintes et de leurs limites que le Cancéropôle Grand-Est et l'Institut Fédératif de Recherche n° 100 (Inserm/Université de Bourgogne) ont organisé à Dijon les 4 et 5 juillet 2006 un colloque intitulé « *Clinical Proteomics in Oncology* ».

Ce colloque a permis de souligner l'importance des étapes pré-analytiques en protéomique clinique. La conduite appropriée de ces étapes est indispensable à la validité de toutes les étapes ultérieures. La vérification des conditions de conservation des protéines *a posteriori* en fait partie. Mikkel West-Nielsen (Danemark) a montré, par chromatographie sur billes magnétiques échangeuses de cations et analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, qu'il suffisait de laisser le sérum à température ambiante plus de 30 minutes pour détecter des fragments du composant C3f du complément ou des fragments de fibrinogène ou de kininogène. Joachim Thiery (Allemagne) a montré l'influence de facteurs tels que la centrifugation ou la congélation sur un profil protéomique réduit à environ 350 signaux entre 1 et 10 kDa.

Les étapes pré-analytiques incluent la définition rigoureuse des conditions de prélèvement, de conditionnement et de conservation des échantillons, analysées dans ce numéro de *Médecine/Sciences* par Daniel Lambert et ses collaborateurs. Gérard Siest (Nancy, France) a souligné au cours du colloque la nécessité de stratégies concertées des différents plateaux techniques à l'initiative des

groupements scientifiques ou des sociétés savantes. Les étapes pré-analytiques sont particulièrement délicates à conduire dans le cadre d'études cliniques prospectives multicentriques et le groupe GOELAMS (Groupe Ouest-Est Leucémies Aiguës Myéloblastiques), représenté par Thierry Fest (Rennes), tente actuellement d'apporter à cette question une réponse aussi efficace que possible en s'appuyant sur l'étude des lymphomes malins non hodgkiniens diffus à grandes cellules B.

Une autre difficulté tient à la complexité du protéome plasmatique et à son hétérogénéité d'un individu à un autre. Beaucoup de marqueurs biologiques susceptibles d'avoir un intérêt prédictif en oncologie se trouvent probablement dans le plasma à des concentrations très inférieures aux seuils de détection des approches actuelles. En d'autres termes, la présence de marqueurs dans le plasma à des concentrations inférieures à 10 ng/ml est probable, mais le seuil actuel de détection est généralement de l'ordre du µg/ml. Des techniques de séparation supplémentaires sont donc nécessaires afin d'éliminer les protéines les plus abondantes et de descendre par étapes successives à un seuil de détection très bas. Par enrichissement, on peut ainsi atteindre l'ordre du pg/ml, ce qui permet à David Speicher (Philadelphie, États-Unis) de détecter jusqu'à 100 protéines de faible abondance par échantillon. Cependant, cette séparation extrême, lourde et complexe, ne peut être appliquée qu'à un faible nombre de patients et beaucoup de marqueurs potentiels identifiés par cette approche seront très difficiles à valider.

La reproductibilité des analyses protéomiques des liquides biologiques est un autre paramètre à prendre en compte dans ces études. La variabilité inter-laboratoire, même en utilisant des équipements différents, n'est pas nécessairement plus importante que la variabilité intra-laboratoire. Là encore, une séparation initiale, fondée par exemple sur une ou des modifications post-traductionnelles des protéines du sérum, peut minimiser la variabilité à condition d'être bien standardisée.

En dépit des difficultés rencontrées, un certain nombre de travaux utilisant la technologie SELDI-TOF (CIPHERGEN) ont été menés à leur terme. Antony Gonçalves et ses collabo-

rateurs en donnant ici un exemple. Ils ont identifié, dans le sérum des patientes atteintes de tumeurs du sein à haut risque analysé immédiatement après chirurgie, un index multiprotéique capable de prédire avec une certaine précision le risque de rechute métastatique. Cette équipe a montré aussi qu'il était possible d'analyser le profil protéique des cellules tumorales et que le profil protéique identifié recoupait les données de l'analyse histologique.

Ulrich Kratzer (Tübingen, Allemagne) a utilisé des techniques de spectrométrie de masse différentielle (par marquage isotopique de la fonction amine des peptides après digestion trypsique) pour comparer le tissu rénal normal et tumoral à la recherche de peptides du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I spécifiques du tissu tumoral, ce qui lui a permis d'identifier un peptide issu de l'hème oxygénase I qui s'est avéré immunogène *in vitro*.

L'équipe de François Berger (Grenoble, France), combinant de multiples approches (*protein array*, SELDI-TOF), a identifié également un nombre limité de marqueurs biologiques des glioblastomes et des méningiomes invasifs (par comparaison aux méningiomes non invasifs). Dans ce dernier cas, les modifications post-traductionnelles de protéines telles que la vimentine sont d'autant plus intéressantes qu'il s'agit de modifications qui, par nature, ne seront pas détectées par une analyse du transcriptome.

Des approches alternatives au *profiling* sont aussi utilisées. Hubert Hondermarck (Lille) montre ici comment les approches protéomiques par électrophorèse 2D peuvent contribuer à l'identification des voies de signalisation intracellulaire activées dans les cellules de cancer du sein en réponse à des facteurs de croissance, permettant de détecter des protéines sécrétées et des interactions protéine-protéine. Isabelle Fournier (Lille, France) montre qu'il est possible de coupler l'analyse protéomique MALDI à l'imagerie afin d'étudier les protéines *in situ* sur les tissus, une approche déjà utilisée avec succès dans le cancer de l'ovaire. Johannes Aubertin (Paris, France), qui s'intéresse plus particulièrement aux tumeurs de la vessie, a montré quant à lui l'intérêt croissant des puces à protéines. Les récentes applications de la LC-FTMS permettent d'accroître la précision et le rendement de l'analyse protéomique, comme l'ont montré Joëlle Vinh (Paris, France) et Bruno Domon (Zurich, Suisse) au cours du colloque. Ce dernier a démontré que la sélection de peptides discriminants associée à un marquage avec des

isotopes stables donnait accès à la quantification des protéines identifiées.

Un autre aspect important dans la recherche de biomarqueurs est l'analyse bio-informatique des données engendrées. Pascal Roy (Lyon, France) a souligné la difficulté à trouver actuellement des modèles statistiques dont la puissance soit suffisante pour identifier les biomarqueurs protéiques présents dans les liquides biologiques. Jeffrey S. Morris (Houston, États-Unis) a insisté sur l'importance des bio-statisticiens dès la mise en place d'une étude et décrit l'ensemble des étapes nécessaires à la validation d'une étude, incluant une analyse rigoureuse des données originales, une normalisation bien faite et le recours à de multiples tests avant de déclarer un bio-marqueur valide. Patrick Ducoroy (Dijon, France) insiste ici sur la taille de l'échantillon qui conditionne, comme dans bien d'autres domaines, la robustesse des conclusions des études protéomiques en oncologie.

L'identification d'un biomarqueur par ces approches protéomiques n'est qu'une étape qui doit conduire à la mise en place d'un test simple, reproductible et sensible, permettant sa validation puis son utilisation en pratique clinique ou en épidémiologie. Si les difficultés sont encore nombreuses avant d'appliquer des approches protéomiques à de très grandes séries d'échantillons et de les valider dans les différents types de tumeur, ce colloque aura permis de mettre en avant les progrès considérables réalisés en quelques années dans ce domaine. Il a été convenu de se retrouver dans 2 ans à Dijon afin de faire le point et d'échanger les dernières informations sur les solutions trouvées aux problèmes posés. ♦

Clinical Proteomics in Oncology - Dijon, France, July 2006



E. Solary

Inserm UMR 517 et IFR 100, Faculté de Médecine,
7, boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France.

esolary@u-bourgogne.fr

TIRÉS À PART

E. Solary