



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2008/07/10
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2009/02/12
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2010/01/13
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2008/051294
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2009/019369
(30) Priorité/Priority: 2007/07/19 (FR0705198)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *G01N 33/574* (2006.01),
C12Q 1/68 (2006.01), *G01N 33/68* (2006.01)

(71) Demandeurs/Applicants:
BIOMERIEUX, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR;
INSTITUT CURIE, FR

(72) Inventeurs/Inventors:
ARPIN, MONIQUE, FR;
BATTAIL-POIROT, NICOLE, FR;
BEAULIEU, CORINNE, FR;
CHARRIER, JEAN-PHILIPPE, FR;
CHOQUET-KASTYLEVSKY, GENEVIEVE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROCEDE DE DOSAGE DE LA PLASTINE-I POUR LE DIAGNOSTIC IN VITRO DU CANCER COLORECTAL
(54) Title: I-PLASTIN ASSAY METHOD FOR THE IN VITRO DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne un procédé de diagnostic in vitro du cancer colorectal par détermination de la présence du marqueur tumoral Plastine-I dans un échantillon biologique issu d'un patient suspecté d'être atteint du cancer colorectal, ledit procédé pouvant être utilisé tant dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique, le pronostic, que dans le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer colorectal.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international

PCT

(43) Date de la publication internationale
12 février 2009 (12.02.2009)(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/019369 A3(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/574 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/051294

(22) Date de dépôt international : 10 juillet 2008 (10.07.2008)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0705198 19 juillet 2007 (19.07.2007) FR(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMÉRIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
Marcy L'etoile (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, Rue
Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). **INSTITUT
CURIE** [FR/FR]; 26 rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ARPIN,**
Monique [FR/FR]; 81 rue d'Alésia, F-75014 Paris (FR).
BATTAIL-POIROT, Nicole [FR/FR]; 6 quai Jules
Courmont, F-69002 Lyon (FR). **BEAULIEU, Corinne**
[FR/FR]; 2 rue de Londres, F-69140 Rillieux La Pape (FR).
CHARRIER, Jean-Philippe [FR/FR]; 28 rue Barthélémy
Thimonnier, F-69160 Tassin La Demi-lune (FR). **CHO-**
QUET-KASTYLEVSKY, Geneviève [FR/FR]; 25
montée Garde, F-69340 Francheville (FR).(74) Mandataire : **BITAUD, Valérie**; bioMérieux, Départe-
ment Propriété Industrielle, chemin de l'Orme, F-69280
Marcy L'etoile (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues
— avec la partie réservée au listage des séquences de la des-
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-
ponible sur demande auprès du Bureau international(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 9 avril 2009(54) Title: I-PLASTIN ASSAY METHOD FOR THE *IN VITRO* DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER(54) Titre : PROCEDE DE DOSAGE DE LA PLASTINE-I POUR LE DIAGNOSTIC *IN VITRO* DU CANCER COLORECTAL(57) Abstract: The invention relates to a method for the *in vitro* diagnosis of colorectal cancer, by determining the presence of the I-plastin tumour marker in a biological sample taken from a patient suspected of having colorectal cancer. Said method can be used for early diagnosis, screening, therapeutic follow-up and prognosis, as well as for relapse diagnosis in relation to colorectal cancer.(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de diagnostic *in vitro* du cancer colorectal par détermination de la présence du marqueur tumoral Plastine-I dans un échantillon biologique issu d'un patient suspecté d'être atteint du cancer colorectal, ledit procédé pouvant être utilisé tant dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique, le pronostic, que dans le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer colorectal.

A3

WO 2009/019369

Procédé de dosage de la Plastine-I pour le diagnostic *in vitro* du cancer colorectal

La présente invention concerne le domaine de la cancérologie. Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un procédé de diagnostic *in vitro* du cancer colorectal chez un patient humain par détermination de la présence de la Plastine-I dans un échantillon biologique issu de ce patient, ledit procédé pouvant être
5 utilisé tant dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique, le pronostic, que dans le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer colorectal.

Le cancer colorectal (CCR) est un problème majeur de santé publique. Son incidence mondiale a été estimée à 875000 nouveaux cas en 1996¹. Tous sexes
10 confondus, c'est le cancer qui survient le plus fréquemment dans les pays occidentaux où il est généralement classé parmi les 3 premières causes de décès par cancer. Le taux de survie à 5 ans tout stade confondu est voisin de 60%.

Seul un diagnostic précoce offre l'espoir d'un traitement curatif. Or, à l'heure actuelle, il n'existe aucun test sérologique de dépistage, ni de diagnostic spécifique qui
15 soit précoce.

Le dépistage du cancer colorectal est réalisé actuellement en Europe avec deux approches distinctes : premièrement à l'aide d'un test paraclinique qui consiste à rechercher la présence de sang dans les selles (Faecal Occult Blood test, FOBT, commercialisé par exemple sous le nom d'Hémoccult®). Cette technique a démontré
20 son utilité clinique. Lorsqu'elle est utilisée tous les 2 ans chez les personnes âgées de 50 à 74 ans, elle peut réduire de 15 à 20% la mortalité par cancer colorectal². Pour cela, il faut que plus de la moitié de la population concernée participe régulièrement au dépistage et qu'une colonoscopie soit faite en cas de test positif, suivie éventuellement d'un traitement adapté.

25 Néanmoins, cette technique de dépistage souffre d'un certain nombre de handicaps :

- L'inconvénient majeur de ce test est sa sensibilité médiocre, tout spécialement pour les adénomes (lésion dysplasique pré-cancéreuse), qui s'ils sont de grande taille conduiront dans 1 cas sur 10 au développement d'un cancer.
- 30 • Le test est également peu spécifique. L'apparition de sang dans les selles peut être liée à une affection non tumorale : hémorragies recto-coliques, hémorroïdes, fistules...

Dans ce cas, une investigation par colonoscopie doit être réalisée avec les inconvénients décrits ci-après.

- Enfin les Hémocult® sont délicats à interpréter, ils doivent donc être lus dans des centres spécialisés, par un personnel qualifié et compétent.

5 Des tests immunologiques spécifiques de l'hémoglobine humaine (Feca EIA®, Heme Select®, ...) ont également été décrits. Ils constituent probablement un progrès par rapport à l'Hémocult® mais ils présentent par essence les mêmes problèmes. C'est ainsi que InSure™, commercialisé par Enterix Inc., permet de détecter 87% des patients atteints de CCR et 47% de ceux ayant des polypes précancéreux. Il s'agit d'un
10 test de détection de l'hémoglobine humaine dans les selles, et plus particulièrement de la portion de globine de cette molécule.

Une deuxième stratégie de dépistage est la réalisation systématique d'une colonoscopie après 50 ans, qui permet en théorie de réduire la mortalité par cancer colorectal. Mais l'acceptabilité de cet examen chez des sujets en bonne santé est trop
15 faible pour qu'une politique de dépistage utilisant l'endoscopie diminue la mortalité (il y a une compliance aux alentours de 2% pour la colonoscopie dans les pays d'Europe ayant mis en place cette stratégie de dépistage). Il existe un risque non négligeable (1‰) de perforation et hémorragie du côlon et de décès (1/10 000), ainsi qu'un coût élevé pour la santé publique. De plus, la colonoscopie nécessite une préparation colique
20 préalable très contraignante, qui explique en grande partie la mauvaise compliance.

Des marqueurs tumoraux dosables par immunoessais ont été décrits de longue date dans le cadre du cancer colorectal. Il s'agit notamment de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) et du CA19-9.

L'ACE est utilisé pour le suivi. Il ne peut pas être utilisé pour le dépistage ni
25 pour le diagnostic précoce du cancer colorectal car sa sensibilité et sa spécificité sont insuffisantes. En effet, ce marqueur est exprimé par d'autres types de cancers, et dans des pathologies bénignes. Malgré tout, il est possible de gagner en sensibilité sans perdre en spécificité en associant à l'ACE un autre marqueur tumoral tel que le CA19-9 ou le CA72-4.

30 Les causes de variations physiologiques du CA19-9 sont rares mais d'autres affections bénignes (hépatobiliaires, pancréatiques), ou malignes peuvent induire une

élévation du CA19-9. Ce marqueur pris isolément ne présente donc pas non plus d'intérêt pour le diagnostic. Néanmoins, sa concentration sérique étant corrélée à la taille de la tumeur et à la présence de métastases, il peut permettre également un suivi thérapeutique ou la mise en évidence précoce de récidives.

5 Des tests commerciaux ont par ailleurs été proposés tels que :

➤ Colopath®/ColorectAlert^{MD}, commercialisé par Ambrilia, est un test de dépistage rapide et peu invasif pour le CCR. Colopath® détecte un plasmalogène (classe de lipides complexes faisant partie des phospholipides) dans le mucus rectal des individus avec une pathologie colorectale, tandis que le ColorectAlert^{MD} détecte
10 l'antigène-T, un sucre complexe dans le mucus rectal. Le test Colopath®/ColorectAlert^{MD} implique l'application de mucus rectal sur une bande de test et le résultat positif ou négatif est basé sur une réaction de Schiff. Ambrilia a étudié 1 787 sujets et démontré que le Colopath®/ColorectAlert^{MD} détecte 54% des cas de cancer colorectal de stade précoce et 49% de tous stades confondus.

15 ➤ COLARIS, commercialisé par Myriad Genetics, est un test de détection dans le sang de mutations dans les gènes MLH1 et MSH2 pour le dépistage des cancers héréditaires du côlon non polyposiques (syndrome HNPCC). Le résultat du test est disponible en 3 semaines. Myriad utilise les techniques de séquençage les plus sensibles et les plus spécifiques existantes à l'heure actuelle. Le coût du test est élevé.

20 ➤ DR-70®, commercialisé par AMDL, est un test de dépistage de différents types de cancers (poumon, côlon, sein, foie, estomac, ...). Il n'est donc pas spécifique du CCR. Son principe est basé sur la technique ELISA double sandwich (dosage de l'antigène DR-70). La révélation se fait par réaction enzymatique (anticorps couplés à la biotine et à la streptavidine). Une réaction colorée indique la présence de cancer.

25 Les Demanderesses ont maintenant mis en évidence de façon surprenante un nouveau marqueur tumoral, lequel est relargué par les tumeurs coliques hors des tissus cancéreux et est caractéristique de ces tumeurs, de sorte qu'il peut être détecté tant dans les échantillons biologiques distants des tumeurs, que dans les tumeurs elles-mêmes.

Ainsi, la présente invention a pour premier objet un procédé de diagnostic *in vitro*
30 du cancer colorectal par détermination de la présence de Plastine-I dans des échantillons biologiques issus de patients suspectés d'être atteints du cancer colorectal,

et de préférence distants des tumeurs.

Elle concerne également l'utilisation de ce procédé tant dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique, le pronostic, que dans le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer colorectal.

5 Le procédé de l'invention permet donc de diagnostiquer de façon spécifique et précoce le cancer colorectal par un test simple consistant à rechercher la présence de Plastine-I dans un échantillon biologique prélevé chez un patient, de préférence distant de la tumeur potentielle. En effet, les Demanderesses ont montré de façon inattendue que les tumeurs coliques non seulement sécrétaient spécifiquement de la Plastine-I
10 mais surtout le relarguaient hors du tissu cancéreux, comme cela sera mis en évidence de façon plus détaillée ci-après, et que sa concentration dans l'échantillon biologique dans lequel on met en œuvre le procédé de l'invention était augmentée par rapport aux valeurs de référence déterminées pour les patients sains.

La détermination de la présence de Plastine-I dans un échantillon biologique
15 distant ou non de la tumeur permet alors de conclure à la pathologie recherchée. Un des avantages du procédé de l'invention réside donc en la possibilité d'utiliser un échantillon distant de la tumeur potentielle à titre d'échantillon de diagnostic, ce qui permet un diagnostic simple et non invasif alors qu'un diagnostic tissulaire nécessite une biopsie prélevée de façon invasive. En effet, l'étude de marqueurs tissulaires, par
20 exemple sur coupe de tissu (immunohistochimie), peut présenter un intérêt pronostique mais n'a aucun intérêt pour le dépistage ou le diagnostic du cancer colorectal.

Le marqueur Plastine-I (N° Swiss Prot Q14651, également appelé I-plastin, Intestine-specific plastin ou Plastin 1) appartient à la famille des Plastines humaines dont trois représentants sont connus : la Plastine-I, la Plastine-L et la Plastine-T.
25 Certains auteurs appellent les Plastines « Fimbrines », d'autres auteurs encore réservent le nom de Fimbrine à la Plastine-I. Les Plastines sont des protéines se liant à l'Actine pour former le cytosquelette (squelette cellulaire). Ce sont des protéines de 70 kDa relativement bien conservées tout au long de l'évolution des Eucaryotes. Elles présentent une forte spécificité tissulaire, seulement une isoforme à la fois est présente
30 dans les tissus normaux³. L'utilisation des Plastines vis-à-vis du cancer a déjà été décrite dans le brevet US-A-5,360,715, qui propose une méthode pour déterminer si

une cellule est hématopoïétique ou néoplasique, c'est-à-dire cancéreuse. Cette méthode revendique le dosage de la Plastine-L et de la Plastine-T au niveau cellulaire, et plus particulièrement le dosage de leurs ARNm. Toutefois, malgré ces propriétés, aucun travail antérieur n'a été réalisé pour évaluer l'intérêt des Plastines dans le cadre du
5 diagnostic du cancer colorectal à partir d'un prélèvement de sérum ou de selles. De plus la Plastine-I n'a même jamais été envisagée comme un marqueur potentiel du cancer⁴. La Demanderesse a montré quant à elle de façon surprenante que cette protéine est un bon marqueur dans les échantillons biologiques issus d'un patient atteint d'un cancer colorectal, lesdits échantillons étant distants ou non de la tumeur.

10 Par la détermination de la présence du marqueur tumoral, on entend la détermination de la présence de la protéine, de son ARN messenger, ou de la détection de modification sur son gène dans les séquences codantes ou non codantes, comme des méthylations.

Par relarguage par les tumeurs coliques, on entend la sécrétion active ou passive
15 ou la libération, quel qu'en soit le mécanisme, du marqueur tumoral par les cellules tumorales elles-mêmes ou par les cellules non tumorales voisines suite à des lésions ou des modifications de phénotype cellulaire résultant du développement tumoral.

Par échantillon biologique dans lequel on met en œuvre le procédé de l'invention, on entend tout échantillon biologique susceptible de contenir le marqueur
20 tumoral d'intérêt. A titre d'exemple d'échantillon biologique non distant de la tumeur, on peut citer les échantillons solides tels que le tissu provenant de la tumeur, de biopsies de cette tumeur, de ganglions lymphatiques, des métastases du patient, et les cellules purifiées à partir de ces échantillons solides. A titre d'exemple d'échantillon biologique distant de la tumeur, on peut citer les fluides biologiques tels que le sang
25 total ou ses dérivés, par exemple sérum ou plasma, les urines, la salive et les épanchements, la moelle osseuse et les selles, et les cellules purifiées à partir de ces échantillons liquides. On préfère le sang, les épanchements ou ses dérivés ainsi que les selles et les cellules purifiées à partir de ces échantillons liquides.

Le procédé de l'invention peut être amélioré en détectant, outre la Plastine-I, au
30 moins un autre marqueur tumoral, le cas échéant également relargué par les tumeurs coliques hors des tissus cancéreux. Ainsi, la combinaison d'au moins deux marqueurs

permet d'améliorer la spécificité et la sensibilité du test de diagnostic du cancer colorectal.

Ainsi, un autre objet de l'invention consiste également à déterminer la présence d'au moins un autre marqueur tumoral choisi parmi les deux groupes de marqueurs suivants, considérés seuls ou en association :

- Groupe A : Leucocyte Elastase Inhibitor, Ezrine, Aminoacylase 1, Liver Fatty Acid-Binding Protein, Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, Apolipoprotéine AI et Apolipoprotéine AII, certains de ces marqueurs étant de nouveaux marqueurs identifiés par la Demanderesse,
- 10 - Groupe B : marqueurs ayant un intérêt diagnostique supplémentaire, à savoir : Beta 2 Microglobuline, Protéasome 20S, Galectine-3, L-Lactate Deshydrogénase Chaîne B, Calréticuline, Regenerating Islet-Derived Protein 3 Alpha, Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1, Kératine type II Cytoskeletal 8, Kératine type I Cytoskeletal 18, Kératine type I Cytoskeletal 19, 15 Epithelial-Cadhérine, ACE, Villine, CA19-9, CA 242, CA 50, CA 72-2, Testostérone, TIMP-1, Cripto-1, Intélectine-1, Protéine Disulfide Isomérase, Cytokératine 20, Translationally-Controlled Tumor Protein, (Pro)défensine-A5, la détection de fragments d'ADN dans le sang ayant des altérations spécifiques de leur profil de méthylation, comme par exemple l'ADN méthylé du gène 20 AXL4 (Aristaless-like Homeobox-4 Gene Methylation) ou l'ADN méthylé du gène Septin-9, la détection d'altérations spécifiques de fragments d'ADN dans les selles comme des mutations spécifiques de l'ADN dans les selles ou des altérations spécifiques du profil de méthylation de l'ADN dans les selles, la détermination d'hémoglobine humaine dans les selles.

25 Le procédé de l'invention peut donc être amélioré en détectant au moins deux marqueurs, l'un étant la Plastine-I, l'autre étant un autre marqueur tumoral choisi dans le Groupe A, à savoir : Leucocyte Elastase Inhibitor, Ezrine, Aminoacylase 1, Liver Fatty Acid-Binding Protein, Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, Apolipoprotéine AI et Apolipoprotéine AII.

30 Par marqueur tumoral nouvellement décrit, on entend la protéine, l'ARN messager ou des modifications spécifiques du gène correspondant, comme des

mutations ou des méthylations.

Le marqueur tumoral Leucocyte Elastase Inhibitor (N° Swiss Prot P30740, également appelé LEI, Serpin B1, Monocyte/neutrophil elastase inhibitor, M/NEI ou EI) a été séquencé en 1992⁵. Le LEI inhibe spécifiquement les protéases ayant des propriétés de type Elastase ou Chymotrypsine par formation de complexe non dissociable sous l'action du SDS⁶. C'est ainsi que le LEI inhibe trois des protéases majeures produites par les neutrophiles : la Leucocyte Elastase, la proteinase-3 et la Cathepsine G. Ces protéases permettent au système immunitaire de défendre l'organisme par protéolyse de substrats extracellulaires ou phagocytés. Mais lorsque ces protéases sont en excès, elles sont responsables de réactions inflammatoires. Le LEI pourrait donc avoir un rôle de régulation et de limitation de l'action inflammatoire induite par les protéases cellulaires. La Demanderesse a montré quant à elle de façon surprenante que cette protéine est un bon marqueur dans les échantillons biologiques issus d'un patient atteint d'un cancer colorectal, lesdits échantillons étant distants ou non de la tumeur.

Le marqueur Ezrine (N° Swiss Prot P15311, également appelé p81, Cytovillin ou Villin-2) est une protéine assurant la liaison entre la membrane cellulaire et les filaments d'Actine du cytosquelette de la cellule, notamment dans les microvillosités des cellules épithéliales intestinales⁷. W.G. Jiang et S. Hiscox⁸ ont montré que les Interleukines IL-2, IL-8, IL-10, ... pouvaient inhiber l'expression d'Ezrine dans la lignée cellulaire de cancer colorectal humaine, HT29. Les mêmes auteurs⁹ ont montré que l'inhibition de l'expression d'Ezrine dans les lignées cellulaires de cancer colorectal, HT115 et HRT18, réduisait l'adhésion entre cellules et augmentait la mobilité et le comportement invasif des cellules. Ils ont conclu que l'Ezrine régulait les adhésions cellule/cellule et cellule/matrice, en interagissant avec les molécules d'adhésion cellulaire, E-Cadhérine et beta-Caténine. Ils ont suggéré que l'Ezrine pouvait jouer un rôle important dans le contrôle du potentiel invasif des cellules cancéreuses. Par ailleurs, T. Xiao et al.¹⁰ ont utilisé un dosage ELISA pour quantifier l'Ezrine plasmatique de patients atteints d'un cancer du poumon. Toutefois, ils n'ont pas observé de différences par rapport à des sujets contrôles. La Demanderesse a montré quant à elle de façon surprenante que cette protéine est un bon marqueur dans

les échantillons biologiques issus d'un patient atteint d'un cancer colorectal, lesdits échantillons étant distants ou non de la tumeur.

Le marqueur Aminoacylase 1 (N° Swiss Prot Q03154, également appelé EC 3.5.1.14, N-Acyl-L-Amino-Acid Amidohydrolase ou ACY-1) fait partie de la famille
5 des Aminoacylases. Ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des acides aminés acylés pour donner des acides gras et des acides aminés¹¹. Un dosage immunochimique de l'activité enzymatique Aminoacylase a été développé dès 1975 par K. Lorentz et al.¹² et a été utilisé pour doser différents tissus et sérums¹³. L'étude a montré une augmentation de l'activité Aminoacylase en cas de pathologies hépatiques mais non en
10 cas de cancer du côlon. Par ailleurs, le gène de l'Aminoacylase 1 a été identifié sur le chromosome 3p21.1¹⁴. La région 3p21.1 est réduite à l'homozygotie lors d'un cancer du poumon à petite cellule, et dans ce cas, l'expression de l'Aminoacylase est réprimée ou indétectable¹⁵. De même S. Balabanov et al.¹⁶ ont montré que l'expression de l'Aminoacylase était réprimée en cas de cancer du rein. La Demanderesse a montré
15 quant à elle de façon surprenante que cette protéine est un bon marqueur dans les échantillons biologiques issus d'un patient atteint d'un cancer colorectal, lesdits échantillons étant distants ou non de la tumeur.

Le marqueur Liver Fatty Acid-Binding Protein (N° Swiss Prot P07148, également appelé L-FABP, FABP1, FABPL, protéine Z ou protéine transporteur de
20 stérol) appartient à la famille des FABP qui comprend neuf isoformes. Chaque isoforme est dénommée d'après le tissu dans lequel elle a été détectée la première fois. Ces isoformes possèdent une communauté de fonction, des structures tridimensionnelles ressemblantes mais leur homologie de séquence n'est pas élevée. La L-FABP a été séquencée en 1985¹⁷. C'est une petite protéine de 15 kDa, abondante
25 dans le cytosol, possédant la capacité de se fixer aux acides gras libres ainsi qu'à la bilirubine. Quelques études récentes semblent indiquer que les altérations de l'expression de la protéine L-FABP pourraient induire un processus de tumorigenèse. Pour le cancer de la prostate, le niveau d'expression des ARNm du L-FABP dans les biopsies de tissu tumoral était 10 fois plus élevé que dans le tissu normal¹⁸. Pour le
30 cancer du côlon, plusieurs équipes ont identifié une diminution de l'expression de la protéine L-FABP au niveau du tissu tumoral comparée à la muqueuse colique normale,

en utilisant des techniques d'électrophorèse en 2 dimensions¹⁹. Ce résultat a aussi été confirmé par des techniques d'immunohistochimie. De plus, la protéine L-FABP est un marqueur pronostic de résection hépatique chez les patients atteints de cancer colorectal ayant métastasé dans le foie²⁰. La Demanderesse a montré quant à elle de façon surprenante que cette protéine est un bon marqueur dans les échantillons biologiques issus d'un patient atteint d'un cancer colorectal, lesdits échantillons étant distants de la tumeur.

Le marqueur Intestinal Fatty Acid-Binding Protein (N° Swiss Prot P12104, également appelé I-FABP, FABP-2 ou FABPI) a été séquencé en 1987²¹. C'est une petite protéine de 15 kDa, abondante dans le cytosol, possédant la capacité de se fixer aux acides gras libres ainsi qu'à la bilirubine. La protéine I-FABP est exprimée au niveau des entérocytes de l'intestin grêle et peut constituer environ 2% du contenu protéique de ce type cellulaire. Au niveau tissulaire, le duodenum et le jejunum contiennent des quantités significativement plus élevées de I-FABP que le côlon (jejunum : 4,8 µg/g, côlon : 0,25 µg/g)²². La I-FABP n'a pas pu être détectée dans les échantillons de plasma de sujets sains. Par contre, dans certains contextes pathologiques comme l'ischémie intestinale, la maladie de Crohn ou la cirrhose biliaire primitive, il est possible de mettre en évidence une augmentation de la concentration de I-FABP plasmatique chez certains sujets²². Pour le cancer de la prostate, il a été montré que le niveau d'expression des ARNm du I-FABP dans les biopsies de tissu tumoral était 7 fois plus élevé que dans le tissu normal¹⁸. Dans le modèle d'induction de tumeur colorectal par l'azoxyméthane chez le rat, le niveau d'expression des ARNm de la I-FABP est diminué de 2,92 à 3,97 fois lorsque les animaux ont une alimentation qui réduit l'incidence de cancer (protéines du soja ou hydrolysate de petit lait)²³. La Demanderesse a montré quant à elle de façon surprenante que cette protéine est un bon marqueur dans les échantillons biologiques issus d'un patient atteint d'un cancer colorectal, lesdits échantillons étant distants de la tumeur.

Les Apolipoprotéines sont une famille de protéines constituées d'acides aminés polaires permettant le transport des lipides dans le sang par formation d'un complexe macromoléculaire hydrophile appelé lipoprotéine. Pour chacune des Apolipoprotéines plasmatiques humaines existent des isoformes issues de polymorphisme génétique

et/ou de modifications post-traductionnelles dont la présence dans le sang peut être associée à certaines pathologies²⁴. La concentration plasmatique des Apolipoprotéines est non négligeable, de l'ordre du mg/ml²⁵.

Le marqueur Apolipoprotéine AI (N° NCBI 490098, également appelé Apo A-I, Apo AI et Apo A1) est une protéine de 243 acides aminés et de 28 kDa. Il est essentiellement synthétisé par le foie et l'intestin. Cette protéine a été montrée sous-abondante dans les sérums de patients souffrant d'un cancer colorectal par rapport aux sujets sains par SELDI-TOF²⁶. Cependant, il est précisé dans cet article que la discrimination des patients atteints de CCR par rapport aux sujets sains est réalisée en combinant l'Apo AI à d'autres marqueurs protéiques. Par ailleurs, cet article précise que le dosage par immunoessai turbidimétrique de l'Apo AI réalisé par une autre équipe ne confirme pas la sous-abondance de cette protéine dans les sérums de patients atteints de CCR²⁷. Hachem et al.²⁸ ont quant à eux dosé l'Apo AI dans des sérums de patients ayant eu le cancer du foie suite à des métastases du cancer colorectal. La Demanderesse a montré quant à elle de façon surprenante qu'un dosage par immunoessai permet de mettre en évidence la diminution de la concentration de cette protéine chez les patients atteints d'un cancer colorectal, contrairement à ce qui était avancé par Engwegen et al.²⁶ qui ont pu mettre en évidence cette diminution uniquement en mettant en œuvre la technique SELDI-TOF. Le dosage par immunoessai de l'Apo AI dans les échantillons biologiques est un bon procédé de diagnostic du cancer colorectal, lesdits échantillons étant distants de la tumeur, dans la mesure où le dosage par immunoessai mis en œuvre n'est pas la turbidimétrie comme utilisée par l'équipe de Zhang et al.²⁷.

Le marqueur Apolipoprotéine AII, (N° Swiss Prot P02652, également appelé ApoA II, Apo-AII, et Apo A2) est une protéine de 17380 Da composée de deux chaînes polypeptidiques de 77 acides aminés chacune reliées par un pont disulfure. Comme l'Apolipoprotéine AI, l'Apolipoprotéine AII est essentiellement synthétisée par le foie et l'intestin. Hachem et al.²⁸ ont également dosé, outre l'Apo AI, l'Apo AII dans des sérums de patients ayant eu le cancer du foie suite à des métastases du cancer colorectal. Toutefois, les résultats ne sont pas significatifs et ne permettent pas une conclusion quant à la pathologie recherchée. La Demanderesse a montré quant à elle de

façon surprenante que la diminution de la concentration de cette protéine chez les patients atteints d'un cancer colorectal en fait un bon marqueur dans les échantillons biologiques issus d'un patient atteint d'un cancer colorectal, lesdits échantillons étant distants de la tumeur.

5 La concentration du marqueur tumoral choisi dans le Groupe A sera, selon le marqueur considéré, augmentée ou diminuée dans l'échantillon biologique dans lequel on met en œuvre le procédé de l'invention par rapport aux valeurs de référence déterminées pour les patients sains.

Le procédé de l'invention peut également être amélioré en associant la détection
10 de la Plastine-I et d'un autre marqueur tumoral choisi dans le Groupe B, à savoir : les marqueurs Beta 2 Microglobuline, Protéasome 20S, Galectine-3, L-Lactate Deshydrogénase Chaîne B, Calréticuline, Regenerating Islet-Derived Protein 3 Alpha, Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1, Keratine type II Cytoskeletal 8, Keratine type I Cytoskeletal 18, Keratine type I Cytoskeletal 19, Epithelial-Cadhérine,
15 ACE, Villine, CA19-9, CA 242, CA 50, CA 72-2, Testostérone, TIMP-1, Cripto-1, Intélectine-1, Protéine Disulfide Isomérase, Cytokératine 20, Translationally-Controlled Tumor Protein, (Pro)défensine-A5, la détection de fragments d'ADN dans le sang ayant des altérations spécifiques de leur profil de méthylation, comme par exemple l'ADN méthylé du gène AXL4 (Aristaless-like Homeobox-4 Gene Methylation) ou l'ADN méthylé du gène Septin-9, la détection d'altérations spécifiques de fragments d'ADN dans les selles comme des mutations spécifiques de l'ADN dans les selles ou des altérations spécifiques du profil de méthylation de l'ADN dans les selles, la détection d'hémoglobine humaine dans les selles. Bien entendu, le procédé de l'invention pourra également mettre en œuvre la détection, dans le même dosage, de la
25 Plastine-I, d'au moins un marqueur tumoral choisi dans le Groupe B et d'au moins un autre marqueur tumoral choisi dans le Groupe A.

Le marqueur Beta 2 Microglobuline (N° Swiss Prot P61769, également appelé β 2 Microglobuline, β 2M) est une protéine de basse masse moléculaire (11 à 12 kDa) trouvée à la surface de la plupart des cellules humaines nucléées. Le taux de β 2
30 Microglobuline sérique augmente chez certains patients atteints de cancer, sans que cette augmentation soit spécifique, ni corrélée avec la nature de la tumeur, son stade ou

la sévérité de la maladie. Une augmentation significative est également observée lors d'autres maladies telles que le lupus érythémateux, l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de Sjogren, les maladies malignes du système lymphoïde (myélome multiple, lymphome à cellules B), certaines maladies virales (hépatites ou SIDA) et chez les patients hémophiles. La $\beta 2$ Microglobuline étant filtrée par les glomérules rénaux et réabsorbée par les tubes contournés proximaux, sa concentration sanguine peut être modifiée en cas de pathologies rénales. C'est ainsi que le dosage de la $\beta 2$ Microglobuline est le plus souvent réservé au diagnostic de pathologies rénales, ou au suivi d'infection par le virus de l'immunodéficience acquise. Toutefois, ce marqueur est connu comme un marqueur tumoral, notamment du cancer du côlon.

Le marqueur Protéasome 20S (également appelé Prosome) est la structure centrale du protéasome qui est lui-même un complexe moléculaire responsable de la dégradation intracellulaire des protéines ubiquitinylées²⁹. Le Protéasome est un complexe moléculaire de 700 kDa constitué de 28 sous-unités associées en 4 anneaux de 7 sous-unités. Chez l'homme, 7 unités alpha ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$) et 10 unités bêta ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$) sont connues. Grâce à ses propriétés catalytiques, le Protéasome joue un rôle central dans les mécanismes de prolifération, de croissance, de régulation et d'apoptose cellulaire et donc dans les voies de cancérisation. L'inhibition du Protéasome par le Bortezomib (Velcade) est un traitement reconnu des myélomes multiples. Des essais thérapeutiques de phase II ou III sont en cours pour des cancers hématologiques ou des tumeurs. T Lavabre-Bertrand et al.³⁰ ont montré que le taux sérique de Protéasome pouvait s'élever à l'occasion de certaines pathologies, notamment en cas de cancers (myélome, lymphome et tumeurs solides).

Le marqueur Galectine-3 (N° Swiss Prot P17931, également appelé Gal-3, Galactose-specific lectin 3, MAC-2 antigen, IgE-binding protein, 35 kDa lectin, Carbohydrate binding protein 35, CBP 35, Laminin-binding protein, Lectin L-29, L-31, Galactoside-binding protein ou GALBP), est une lectine capable de se lier à des structures beta-galactosidique de type N-acetyllactosamine. C'est une protéine à fonctions multiples impliquée dans diverses fonctions biologiques, incluant l'adhésion des cellules tumorales, la prolifération, la différenciation, l'angiogénèse, l'apoptose, la

progression cancéreuse métastatique³¹. Différents travaux ont montré que Gal-3 pouvait se complexer avec de nombreuses molécules : ACE, IgE, Laminine, Mucine, Mac-2BP, LAMP1, LAMP2, Fibronectine, etc. Un dosage sérique de Gal-3 a été décrit par I. Iurisci et al.³². Gal-3 était capturée sur des microplaques revêtue de Mac-2-binding protein (une protéine liant Gal-3) puis révélée avec un anticorps de rat anti-Gal-3. Cette étude a montré une élévation sérique de Gal-3 en cas de cancers gastro-intestinaux, du sein, du poumon, de l'ovaire, de mélanomes et de lymphomes non-Hodgkinien.

Le marqueur L-Lactate Deshydrogénase Chaîne B (N° Swiss Prot P07195, également appelé LDH-B, LDH Heart Unit ou LDH-H) est une protéine pouvant se complexer sous forme d'homotétramère. Cette protéine peut également se complexer avec la protéine L-Lactate Deshydrogénase Chaîne A (N° Swiss Prot P00338, également appelé LDH-A, LDH Muscle Unit ou LDH-M) sous forme d'hétérotétramères. La dose sérique et/ou l'activité enzymatique sérique des complexes tétramérique, baptisé LDH, augmente dans la circulation sanguine proportionnellement à la masse tumorale pour de nombreuses tumeurs solides. Son utilisation est recommandée en association avec la gonadotrophine chorionique humaine (beta-hCG) et la phosphatase alcaline placentaire pour le suivi des cancers séminaux. La LDH est considérée comme un marqueur d'intérêt pour le pronostic des lymphomes, de la leucémie et du cancer du côlon³³.

Le marqueur Calréticuline (N° Swiss Prot P27797, également appelé CRP55, Calregulin, HACBP, ERp60 ou grp60) est une protéine multifonctionnelle. C'est une lectine capable d'interagir transitoirement avec la quasi-totalité des protéines monoglycosylées du réticulum endoplasmique. C'est ainsi que D.J. McCool et al.³⁴ ont montré que la Calréticuline était impliquée dans la maturation de la mucine colique MUC2. Une méthode de diagnostic du CCR utilisant un dosage de la Calréticuline dans un tissu, les selles ou un fluide corporel est décrit dans la demande de brevet WO03/065003.

Le marqueur Regenerating Islet-Derived Protein 3 Alpha (N° Swiss Prot Q06141, également appelé Reg III-alpha, Pancreatitis-associated protein 1 ou Pancreatis Associated Protein I (PAP 1)) est une protéine faiblement exprimée dans le

pancréas sain. Elle est surexprimée durant les phases aiguës de pancréatite et chez certains patients souffrant de pancréatite chronique. Elle apparaît alors dans le liquide pancréatique et dans la circulation sanguine³⁵. Y. Motoo et al.³⁶ ont montré par dosage ELISA que le taux de PAP 1 sanguine augmentait chez certains patients atteints de cancer du côlon, de l'estomac, du foie ou du pancréas, ainsi qu'en cas d'insuffisance rénale. Ils ont pour ce faire utilisé le test ELISA (PANCEPAP) commercialisé par la société Dynabio (La Gaude, France).

Le marqueur Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1 (N° Swiss Prot P16422, également appelé Major gastrointestinal tumor-associated protein GA733-2, Epithelial cell surface antigen, EpCAM, Epithelial glycoprotein, EGP, Adenocarcinoma-associated antigen, KSA, KS 1/4 antigen, Cell surface glycoprotein Trop-1 ou CD326 antigen) a été caractérisé en 1979 par sa capacité à être reconnu par un anticorps dirigé contre des cellules de cancer colorectal³⁷. Cette protéine est connue sous différents noms, comme indiqué précédemment, mais l'usage le plus fréquent est de l'appeler EpCAM. C'est une protéine transmembranaire exprimée sur la surface basolatérale des cellules, dans certains épithéliums et de nombreux cancers³⁸. Dès 1982 Herlyn et al.³⁹ ont montré que l'injection d'un anticorps monoclonal anti-EpCAM pouvait inhiber la croissance tumorale de patients atteints de cancer colorectal. Ces résultats ont conduit au développement d'un traitement anti-tumoral à base d'un anticorps anti-EpCAM nommé Edrecolomab. Ce traitement est commercialisé sous le nom de PanorexTM. Par ailleurs, H Abe et al.⁴⁰ ont montré par dosage ELISA qu'une forme soluble d'EpCAM, baptisée MK-1, était augmentée dans la circulation sanguine de 10% chez les patients cancéreux étudiés.

Les cytokératines font partie des protéines qui composent les filaments intermédiaires du cytosquelette des cellules épithéliales. Actuellement, plus de 20 cytokératines humaines ont été identifiées. Les cytokératines 8 (N° Swiss Prot P05787, également appelé Cytokeratin-8, CK-8, Keratin-8 ou K8), 18 (N° Swiss Prot P05783, également appelé Cytokeratin-18, CK-18, Keratin-18 ou K18), et 19 (N° Swiss Prot P08727, également appelé Cytokeratin-19, CK-19, Keratin-19 ou K19) sont les plus abondantes dans les cellules épithéliales et sont des outils utiles pour le diagnostic de pathologies cancéreuses⁴¹. Cet intérêt clinique est lié à la libération de cytokératines

par les cellules épithéliales en phase d'apoptose ou de prolifération. En cas d'apoptose, cette libération se fait sous forme de fragments solubles qui semble apparaître sous l'action protéolytique de Caspases. Des formes de cytokératines non dégradées n'ont jamais été décrites dans la circulation sanguine. Les trois dosages de cytokératines les plus utilisés en clinique sont le dosage de l'antigène polypeptidique tissulaire (TPA), de l'antigène polypeptidique tissulaire spécifique (TPS), et CYFRA 21-1. TPA est un test de spectre large qui mesure les cytokératines 8, 18, et 19. Les dosages de TPS et de CYFRA 21-1 sont plus spécifiques et mesurent respectivement des fragments de la cytokératine 18 et de la cytokératine 19. Ces 3 dosages détectent des fragments solubles de cytokératines pouvant être présents isolément ou sous forme de complexes protéiques. TPA, TPS ou CYFRA-21-1 ont été utilisés pour le suivi thérapeutique des cancers colorectaux, du sein, du poumon, de la vessie, de l'ovaire, du pancréas, de la prostate et de certains cancers ORL. Le dosage sanguin des fragments solubles de cytokératines a en effet une valeur clinique pour dépister les récives ou évaluer la réponse à la thérapie engagée (radiothérapie, chimiothérapie, traitement hormonal). Un dosage régulier permet notamment d'évaluer la progression de la masse tumorale. La dose de cytokératines sanguines solubles a également un aspect pronostique vis-à-vis du stade tumoral et de la formation de métastase. Actuellement le dosage sanguin de cytokératine le plus utilisé est CYFRA 21-1. Il est fortement recommandé pour le suivi de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. Il existe divers dosages commerciaux pour TPA (AB Sangtec Medical Co., Byk-Roland...), TPS (IDL Biotech AB, BEKI Diagnostics...) et CYFRA-21-1 (Roche Diagnostics, CIS Bio-International, Fujirebio Diagnostics...). Par ailleurs, H. Kim et al.⁴² ont montré que le dosage dans les selles de cytokératine 19 (DiNonA Inc.) pouvait être utile au dépistage de maladies digestives en association avec un dosage de sang occulte dans les selles. Enfin, l'utilisation de la Cytokératine 20 (N° Swiss Prot P35900, également appelé Keratin, type I cytoskeletal 20, CK-20, Keratin-20, K20, ou Protein IT) en tant que marqueur dans le cancer colorectal est décrite dans la demande de brevet US2002/0160382.

Le marqueur Epithelial-Cadhérine (N° Swiss Prot P12830, également appelé E-cadherin, Uvomorulin, Cadherin-1, CAM 120/80 ou CD324 antigen) est une protéine transmembranaire médiatrice de l'adhésion cellulaire calcium dépendante. Elle est

spécifiquement exprimée dans les cellules épithéliales, où elle est impliquée dans le maintien de leur phénotype. Le domaine cytoplasmique de l'E-Cadhérine se lie à la β -Caténine, qui est elle-même liée aux réseaux de filaments d'actine du cytosquelette. Cette liaison l'E-Cadhérine/ β -Caténine joue un rôle critique pour stabiliser les adhésions cellules/cellules du tissu épithélial. La perte d'E-Cadhérine peut donc réduire l'adhésion cellulaire et augmenter le pouvoir invasif des cellules cancéreuses. Une réduction d'expression d'E-Cadhérine ou de β -Caténine est généralement associée avec une dédifférenciation et une agressivité plus importante de la tumeur, notamment pour les cancers digestifs. C'est ainsi que F. Roca et al.⁴³ ont montré que les patients atteints d'un cancer colorectal et sous-exprimant l'E-Cadhérine avaient un pronostic plus péjoratif que les patients ayant un niveau d'expression normal. Dès 1983, Damsky et al.⁴⁴ ont montré qu'une forme soluble d'E-Cadhérine pouvait être libérée par la lignée cellulaire du cancer du sein MCF-7. Cette forme soluble correspond au clivage de la partie extracellulaire de l'E-Cadhérine. Plus tard, M. Katayama et al.⁴⁵ ont montré que la forme soluble de l'E-Cadhérine pouvait être libérée dans la circulation sanguine en cas de cancer et C. Willmanns et al.⁴⁶ ont montré que l'augmentation de la dose d'E-Cadhérine sanguine était corrélée au stade tumoral pour les cancers colorectaux. Un kit commercial est par ailleurs proposé par la société Takara BioChemicals (Tokyo, Japon).

Le dosage de l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) pour le diagnostic du cancer colorectal a été proposé depuis 1965 par P. Gold et S. Freedman⁴⁷, mais un dosage sanguin de ce marqueur a une sensibilité médiocre pour le diagnostic de cancers colorectaux à un stade peu avancé. C'est ainsi que le dosage de l'ACE sérique est surtout recommandé pour évaluer le risque de métastases hépatiques⁴⁸ et pour le suivi thérapeutique. En outre, c'est un marqueur peu spécifique du cancer colorectal, il peut en effet être augmenté dans de nombreux autres cancers (poumon, sein, ...). En revanche, le dosage d'ACE dans les selles semble plus sensible et plus spécifique que le dosage de l'ACE sérique ou que le dosage de sang dans les selles⁴⁹. Ce dosage n'est toutefois pas encore proposé en routine.

Les déterminants antigéniques 1116-NS-19-9 réactifs, plus communément baptisés CA19-9 (Carbohydrate Antigen 19.9), sont portés par des protéines de poids

moléculaires élevés⁵⁰. Le dosage sanguin de CA 19-9 est plus spécifique que celui de l'ACE. Le taux de CA 19-9 sanguin augmente en cas de cancer colorectal, du pancréas et du foie (cholangiocarcinome), mais aussi en cas de pathologies non cancéreuses (cholangites, ...). Son usage en association avec l'ACE est recommandé tant au
5 moment du diagnostic d'un cancer que pour le suivi de la pathologie.

J. Holmgren et al.⁵¹ ont montré que la dose sérique d'antigène CA 50 était augmentée en cas de cancer colorectal. L'antigène CA 50 est défini par sa faculté à être reconnu par un anticorps monoclonal spécifique.

S'agissant du marqueur CA 72, T.L. Klug et al.⁵² ont montré que la dose sérique
10 d'antigène CA 72 était augmentée en cas de cancer colorectal. L'antigène CA 72 est défini par sa faculté à être reconnu par un anticorps monoclonal spécifique.

De même, P. Kuusela et al.⁵³ ont montré que la dose sérique d'antigène CA 242 était augmentée en cas de cancer colorectal. L'antigène CA 242 est défini par sa faculté à être reconnu par un anticorps monoclonal spécifique.

15 Le dosage de la Testostérone pour le diagnostic du cancer colorectal a été proposé chez les hommes par M. Holland et al.⁵⁴. Ces auteurs ont montré un effondrement du taux de Testostérone sanguine en cas de cancer colorectal.

S'agissant du marqueur TIMP-1, ou Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase Type-1, la demande de brevet US 2007/0020707 décrit notamment
20 le dosage de TIMP-1 pour le diagnostic du cancer colorectal à l'aide d'un dosage dans un fluide corporel.

F. Model et al.⁵⁵ ont montré en juillet 2006, lors du congrès World Congress on Gastrointestinal Cancer, qu'il était possible de détecter des formes méthylées du gène de la Septin-9 dans le plasma de patients atteints de cancer colorectal.

25 M.P. Ebert et al.⁵⁶ ont montré que le gène ALX4, ou Aristaless-like homeobox-4, était plus souvent méthylé dans les sérums de patients atteints d'un cancer colorectal que dans les sérum contrôles ($P < 0,0001$). En utilisant une valeur seuil de 41,4 pg/mL, ils ont obtenu une sensibilité de 83,3% et une spécificité de 70%.

La Villine est décrite en tant que marqueur sanguin pour le diagnostic du cancer
30 colorectal dans la demande de brevet FR2581456.

C. Bianco et al.⁵⁷ ont montré que la dose sérique de Cripto-1 était augmentée en

cas de cancer colorectal.

Le dosage de l'Intélectine-1 (N° Swiss Prot Q8WWA0, également appelé Intestinal lactoferrin receptor, Galactofuranose-binding lectin, Endothelial lectin HL-1 ou Omentin) pour le diagnostic du cancer colorectal a été décrit dans la demande de
5 brevet US2003/0082533.

L'utilisation de la Protéine Disulfide Isomérase (N° Swiss Prot P07237, également appelé EC 5.3.4.1, PDI, Prolyl 4-hydroxylase subunit beta, Cellular thyroid hormone-binding protein ou p55), de la Translationally-Controlled Tumor Protein (N° Swiss Prot P13693, également appelé TCTP, p23, Histamine-releasing factor, HRF ou
10 Fortilin) et de la (Pro)défensine-A5 (N° Swiss Prot Q01523) en tant que marqueurs dans le cancer colorectal est décrite respectivement dans les demandes de brevet EP1724586, US2003/0172388 et US2006/0179496. Par (Pro)défensine, on entend, le précurseur, à savoir la Prodéfensine avant clivage, le propeptide, à savoir la moitié N-terminale après clivage de la Prodéfensine, et la protéine mature, à savoir la Défensine,
15 correspondant à la moitié C-terminale après clivage.

Enfin, le dosage de l'hémoglobine humaine dans les selles est connu et peut être mis en œuvre comme décrit précédemment.

La concentration du marqueur tumoral choisi dans le Groupe B sera, selon le marqueur considéré, augmentée ou diminuée dans l'échantillon biologique dans lequel
20 on met en œuvre le procédé de l'invention par rapport aux valeurs de référence déterminées pour les patients sains.

De préférence, le ou les marqueurs tumoraux du groupe B sont choisis parmi : les marqueurs : Beta 2 Microglobuline, Protéasome 20S, Galectine-3, L-Lactate Deshydrogénase Chaîne B, Calréticuline, Regenerating Islet-Derived Protein 3 Alpha,
25 Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1, Epithelial-Cadhérine, ACE, CA19-9, Testostérone, TIMP-1, Intélectine-1, Protéine Disulfide Isomérase, Cytokératine 20, Translationally-Controlled Tumor Protein, (Pro)défensine-A5, détection d'hémoglobine humaine dans les selles.

Bien entendu, le procédé de l'invention peut également inclure la détection de
30 tout autre marqueur du cancer colorectal connu de l'homme du métier.

Comme indiqué précédemment, on détecte le ou les marqueurs tumoraux

d'intérêt soit sous forme de protéine, soit sous forme d'ARN messager, soit par altération de l'ADN correspondant (mutation ou modification des méthylations).

La détermination de la présence, dans l'échantillon biologique, du marqueur tumoral d'intérêt « protéine » peut être mis en œuvre par tout procédé de détermination
5 de la présence d'une protéine dans un échantillon, connu de l'homme du métier, comme par exemple par un test biochimique, y compris un dosage immunologique, ou par spectrométrie de masse.

Le test biochimique peut être tout test largement connu de l'homme du métier impliquant des interactions moléculaires, à savoir des réactions entre ledit marqueur
10 tumoral et un ou des partenaire(s) de liaison spécifique(s) ou non dudit marqueur tumoral.

De préférence, le test biochimique est un dosage immunologique connu de l'homme du métier impliquant des réactions immunologiques entre le marqueur tumoral qui est l'antigène et un ou des partenaire(s) de liaison spécifique(s) que sont les
15 anticorps dirigés contre cet antigène.

Les partenaires de liaison spécifiques ou non du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention sont tout partenaire susceptible de se lier à ce ou ces marqueurs. Ils sont dits spécifiques quand ils sont capables de se lier à ces marqueurs avec une spécificité élevée, voire une spécificité de 100%. Ils sont dits non
20 spécifiques lorsque leur spécificité de liaison à ces marqueurs est faible et qu'ils sont alors capables de se lier à d'autres ligands, tels que des protéines. A titre d'exemple, on peut citer les anticorps, les fractions d'anticorps, les récepteurs et toute autre molécule capable de se lier à ce marqueur.

Les anticorps partenaires de liaison sont par exemple soit des anticorps
25 polyclonaux, soit des anticorps monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec le marqueur tumoral concerné, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité
30 sur une colonne sur laquelle est fixé un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment ledit marqueur.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris avec le marqueur tumoral d'intérêt, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis dudit marqueur tumoral pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert (Western blot) en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

Les anticorps monoclonaux peuvent être également des anticorps recombinants obtenus par génie génétique, par des techniques bien connues de l'homme du métier.

Des exemples d'anticorps anti-Leucocyte Elastase Inhibitor sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Abcam, anticorps polyclonal de lapin anti-LEI, Cat. No. Ab47731. Un anticorps monoclonal anti-LEI Clone ELA-1 a été décrit dans l'article de --Yasumastu et al.⁵⁸.

Des exemples d'anticorps anti-Ezrine sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Abcam, anticorps monoclonal anti-Ezrine Clone 3C12, Cat. No. Ab4069 et anticorps polyclonal de lapin anti-Ezrine, Cat. No. Ab47418.

Des exemples d'anticorps anti-Aminoacylase 1 sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Abnova, anticorps monoclonal anti-Aminoacylase 1 Clone 4F1-B7, Cat. No. H00000095-M01, et dans le catalogue Abcam, anticorps polyclonal de poule anti-Aminoacylase 1, Cat. No. Ab26173.

Des exemples d'anticorps anti-Liver Fatty Acid-Binding Protein sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Abcam, anticorps monoclonal anti-L-FABP Clone 6B6, Cat. No. Ab10059 et anticorps polyclonal de lapin anti-L-FABP,

Cat. No. Ab7807.

Des exemples d'anticorps anti-Intestinal Fatty Acid-Binding Protein sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue R&D Systems, anticorps monoclonal anti-I-FABP Clone 323701, Cat. No. MAB3078, et dans le catalogue
5 Abcam, anticorps polyclonal de lapin anti-I-FABP, Cat. No. Ab7805.

Des exemples d'anticorps anti-Apolipoprotéine AI sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Biodesign Meridian Life Sciences, anticorps monoclonal anti-Apo AI Clone 4A90, Cat. No. H45402M et anticorps polyclonal de chèvre anti-Apo AI, Cat. No. K45252P.

10 Des exemples d'anticorps anti-Apolipoprotéine AII sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue US Biological, anticorps monoclonal anti-Apo AII Clone 1402, Cat. No. A2299-31C et dans le catalogue Biodesign Meridian Life Sciences anticorps polyclonal de chèvre anti-Apo AII, Cat. No. K74001P.

Des exemples d'anticorps polyclonaux anti-Plastine-I sont connus et sont
15 disponibles notamment dans le catalogue Santa Cruz Biotechnology. L'anticorps polyclonal de lapin H-300 (Cat. No. sc-28531) réagit avec les Plastines-I, L et T. Aucun anticorps monoclonal dirigé contre la Plastine-I n'est disponible à ce jour. La Demanderesse a quant à elle mis au point des anticorps monoclonaux dirigés contre la Plastine-I, ce qui constitue un autre objet de l'invention.

20 Des exemples d'anticorps anti-Beta2 Microglobuline, anti-ACE, anti-CA19-9 et anti-Testostérone sont connus et sont notamment utilisés dans les trousse de dosage de la Demanderesse, respectivement Vidas® 2 Microglobulin, Vidas® ACE, Vidas® CA19-9™ et Vidas® Testostérone.

Des exemples d'anticorps anti-Protéasome 20S sont connus et sont disponibles
25 notamment dans le catalogue d'Affinitiy Research Products.

Des exemples d'anticorps anti-Galectine-3, anti-L-Lactate Deshydrogénase Chaîne B, anti-Calréticuline, anti-Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1, anti-Keratine type II Cytoskeletal 8, anti-Keratine type I Cytoskeletal 18, anti-Keratine type I Cytoskeletal 19, anti-Epithelial-Cadhérine, anti-Villine et anti-TIMP-1 sont
30 connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Abcam.

Des exemples d'anticorps anti-Regenerating Islet-Derived Protein 3 Alpha sont

connus et sont notamment utilisés dans les trousse de dosage de Dynabio (La Gaude, France).

Des exemples d'anticorps anti-CA 242, anti-CA 50, anti-CA 72-4 sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Fujirebio.

5 Des exemples d'anticorps anti-Intélectine-1 sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Alexis Biochemicals, anticorps monoclonal anti-Intélectine-1 Clone Saly-1, Cat. No. ALX-804-850-C100 et anticorps polyclonal de lapin anti-Intélectine-1, Cat. No. ALX-210-941.

Des exemples d'anticorps anti-Protein Disulfide Isomérase sont connus et sont
10 disponibles notamment dans le catalogue Abcam, anticorps monoclonal anti-PDI Clone RL77, Cat. No. Ab5484 et anticorps polyclonal de lapin anti-PDI, Cat. No. Ab3672.

Des exemples d'anticorps anti-Cytokératine 20 sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Abcam, anticorps monoclonal anti-Cytokératine 20 Clone Ks20.8, Cat. No. Ab962 et anticorps polyclonal de lapin anti-Cytokératine 20, Cat. No.
15 Ab36756.

Des exemples d'anticorps anti-TCTP sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Abnova, anticorps monoclonal anti-TCTP Clone 3C7, Cat. No. 157H00007178-M01 et anticorps polyclonal anti-TCTP, Cat. No. 157H00007178-A01.

20 Des exemples d'anticorps anti-Défensine-A5 sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue Santa Cruz Biotechnology, anticorps monoclonal anti-Défensine-A5 Clone 8C8, Cat. No. sc-53997, et dans le catalogue Alpha Diagnostic International Inc., anticorps polyclonal de lapin anti-Défensine-A5, Cat. No. HDEFA51-A.

25 Les partenaires de liaison spécifiques ou non du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention peuvent être utilisés comme réactif de capture, comme réactif de détection ou comme réactifs de capture et de détection.

La visualisation des réactions immunologiques, c'est-à-dire de la liaison marqueur tumoral/partenaire de liaison, peut être effectuée par tout moyen de détection,
30 tels que des moyens directs ou indirects.

Dans le cas de la détection directe, c'est-à-dire sans l'intermédiaire d'un marquage, on observe les réactions immunologiques par exemple par résonance plasmonique de surface ou par voltamétrie cyclique sur une électrode portant un polymère conducteur.

5 La détection indirecte se fait par l'intermédiaire d'un marquage, soit du partenaire de liaison dit réactif de révélation, soit du marqueur tumoral d'intérêt lui-même. On parle alors dans ce dernier cas de méthode de compétition.

Par marquage, on entend la fixation d'un réactif marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces
10 réactifs marqueurs consiste en :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la β -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants,
- 15 • les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I , et
- les molécules fluorescentes telles que les Alexa ou les phycocyanines.

Des systèmes indirects de détection peuvent être aussi utilisés, comme par exemple des ligands capables de réagir avec un anti-ligand. Les couples ligand/anti-ligand sont bien connus de l'homme du métier, ce qui est le cas par exemple des
20 couples suivants : biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand qui porte le partenaire de liaison. L'anti-ligand peut être détectable directement par les réactifs marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un ligand/anti-ligand.

25 Ces systèmes indirects de détection peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est bien connue de l'homme du métier, et l'on pourra se reporter aux demandes de brevet antérieures FR98/10084 ou WO-A-95/08000 de la Demanderesse ou à l'article de Chevalier et al.⁵⁹.

30 Selon le type de marquage utilisé, l'homme du métier ajoutera des réactifs permettant la visualisation du marquage.

A titre d'exemple de tests immunologiques tels que définis ci-dessus, on peut citer les méthodes « sandwich » telles qu'ELISA, IRMA et RIA, les méthodes dites de compétition et les méthodes d'immunodétection directe comme l'immunohistochimie, l'immunocytochimie, le Western-blot et le Dot-blot.

5 La spectrométrie de masse peut également être utilisée pour la détection dans le fluide biologique du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention. Le principe de la spectrométrie est largement connu de l'homme du métier et est décrit par exemple dans Patterson, S.⁶⁰.

10 Pour ce faire, l'échantillon biologique préalablement traité ou non est passé dans un spectromètre de masse et on compare le spectre obtenu avec celui du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention. Un exemple de traitement préalable de l'échantillon consiste à le faire passer sur un support d'immunocapture, comportant un des partenaires de liaison du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention, par exemple un anticorps dirigé
15 contre le ou les marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention. Un autre exemple de traitement préalable de l'échantillon peut être le pré-fractionnement de l'échantillon biologique, afin de séparer entre elles les protéines de l'échantillon. Dans des techniques bien connues de l'homme du métier, on peut par exemple tout d'abord dépler les protéines majoritaires de l'échantillon.

20 Grâce à des avancées technologiques récentes, il est également devenu possible de quantifier des protéines dans les milieux biologiques complexes en utilisant la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) mise en œuvre en utilisant un analyseur triple quadripôle fonctionnant en mode MRM (multiple reaction monitoring). Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité (deux analyseurs, sélections de l'ion
25 parent et de l'ion produit) et la sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage. La faisabilité technique de cette approche a été démontrée récemment par Anderson et Hunter⁶¹ qui ont réussi à détecter des protéines dont la concentration est de l'ordre de la centaine de ng/ml dans le plasma, après immunodépletion des protéines les plus abondantes.

30 La détermination de la présence, dans l'échantillon biologique, du marqueur tumoral d'intérêt « ARNm » peut être mis en œuvre par tout procédé de détermination

de la présence d'ARNm dans un échantillon, à savoir soit la détection directe de l'ARNm, soit la détection indirecte de l'ARNm, ou tout autre procédé de détermination de la présence d'un ARN dans un échantillon, connu de l'homme du métier.

Par détection directe de l'ARNm, on entend la mise en évidence de l'ARNm
5 lui-même dans l'échantillon biologique.

La détection directe de l'ARNm dans l'échantillon biologique peut être mise en œuvre par tout moyen connu de l'homme du métier, comme par exemple par hybridation avec un partenaire de liaison spécifique de l'ARNm, le cas échéant après amplification par la technique PCR ou NASBA.

10 Par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques se lient avec des liaisons hydrogènes stables et spécifiques pour former un complexe double brin. Ces liaisons hydrogène se forment entre les bases complémentaires Adénine (A) et Thymine (T) (ou Uracile (U)) (on parle de liaison A-T) ou entre les bases complémentaires Guanine (G) et Cytosine
15 (C) (on parle de liaison G-C). L'hybridation de deux fragments nucléotidiques peut être totale (on parle alors de fragments nucléotidiques ou de séquences complémentaires), c'est-à-dire que le complexe double brin obtenu lors de cette hybridation comprend uniquement des liaisons A-T et des liaisons C-G. Cette hybridation peut être partielle (on parle alors de fragments nucléotidiques ou de séquences suffisamment
20 complémentaires), c'est-à-dire que le complexe double brin obtenu comprend des liaisons A-T et des liaisons C-G permettant de former le complexe double brin, mais également des bases non liées à une base complémentaire. L'hybridation entre deux fragments nucléotidiques dépend des conditions opératoires qui sont utilisées, et notamment de la stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la
25 composition en bases des deux fragments nucléotidiques, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux fragments nucléotidiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. Toutes ces données sont bien connues et
30 les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier. En général, selon la longueur des fragments nucléotidiques que l'on souhaite hybrider, la

température d'hybridation est comprise entre environ 20 et 70°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1 M. Les partenaires de liaison spécifiques ou non de l'ARNm sont tout partenaire susceptible de se lier à cet ARNm. A titre d'exemple, on peut citer les sondes nucléiques, les amorces d'amplification, et toute autre molécule capable de se lier à cet ARNm.

Par sonde d'hybridation, on entend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 motifs nucléiques, notamment de 10 à 35 motifs nucléiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec le matériel spécifique du gène cible d'intérêt. La sonde d'hybridation peut comprendre un marqueur permettant sa détection.

Au sens de la présente invention, on entend par amorce d'amplification, un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 motifs nucléiques, préférentiellement de 15 à 30 motifs nucléiques permettant l'initiation d'une polymérisation enzymatique, telle que notamment une réaction d'amplification enzymatique. Par réaction d'amplification enzymatique, on entend un processus générant de multiples copies d'un fragment nucléotidique par l'action d'au moins une enzyme. De telles réactions d'amplification sont bien connues de l'homme du métier et on peut citer notamment les techniques suivantes :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US 4,683,195, US 4,683,202 et US 4,800,159,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO 91/02818, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US 5,399,491.

Par détection, on entend soit une méthode physique, soit une méthode chimique avec un agent colorant intercalant tel que SYBR® Green I ou le bromure d'éthidium, soit une méthode de détection à l'aide d'un marqueur. De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques⁶². Les marqueurs appropriés sont tels que définis précédemment.

Au sens de la présente invention, la sonde d'hybridation peut être une sonde dite de détection. Dans ce cas, la sonde dite de détection est marquée au moyen d'un marqueur tel que défini précédemment. Grâce à la présence de ce marqueur, on peut

détecter la présence d'une réaction d'hybridation entre une sonde de détection donnée et le transcrit à détecter.

La sonde de détection peut être notamment une sonde de détection « molecular beacons »⁶³. Ces « molecular beacons » deviennent fluorescentes lors de l'hybridation.

5 Elles possèdent une structure de type tige-boucle et contiennent un fluorophore et un groupe « quencher ». La fixation de la séquence de boucle spécifique avec sa séquence complémentaire d'acide nucléique cible provoque un déroulement de la tige et l'émission d'un signal fluorescent lors de l'excitation à la longueur d'onde qui convient.

10 La sonde d'hybridation peut être également une sonde dite de capture. Dans ce cas, la sonde dite de capture est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption. Les supports solides appropriés sont connus de l'homme du métier et on peut citer à titre d'exemples les matériaux de synthèse ou les matériaux
15 naturels, les latex, les particules magnétiques, les dérivés métalliques, les gels, etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO-A-94/12670, d'une particule. On peut également immobiliser sur le support plusieurs sondes de capture différentes, chacune étant spécifique d'un transcrit cible. En particulier, on peut utiliser comme support une
20 biopuce sur laquelle peuvent être immobilisées un grand nombre de sondes.

L'immobilisation des sondes sur le support est également connue de l'homme du métier et on peut citer un dépôt de sondes par transfert direct, la micro-déposition, la synthèse *in situ* et la photolithographie.

La mise en évidence, dans l'échantillon biologique, des modifications ou
25 anomalies d'ADN au niveau du gène codant pour le marqueur tumoral d'intérêt peut être réalisée par tout procédé de détermination des altérations de l'ADN dans un échantillon, à savoir soit la détection directe de mutations, soit la mise en évidence d'altérations dans le profil de méthylation des loci d'intérêt, ou tout autre procédé de détermination d'altérations de l'ADN dans un échantillon, connu de l'homme du
30 métier.

Les mutations peuvent inclure des substitutions ponctuelles d'un nucléotide par

un autre, des délétions de un ou plusieurs nucléotides et des insertions de un ou plusieurs nucléotides. Les mutations peuvent être situées dans la partie codant du gène du marqueur tumoral d'intérêt, ou dans les parties 5' et 3' non codant comme la région promotrice ou la région terminatrice de transcription.

5 Les stratégies de mise en évidence de mutation s'appuient sur les techniques de la biologie moléculaire et comprennent des étapes d'extraction d'ADN, d'amplification par PCR ou autre technique d'amplification, d'hybridation et/ou de séquençage. Dans le cas du cancer colorectal, le procédé suivant a été utilisé avec succès pour réaliser la
10 détection de mutations dans l'ADN des selles : concentration de l'ADN par précipitation, enrichissement en cible en utilisant des oligonucléotides de capture sur billes magnétiques, amplification PCR des gènes d'intérêt, séquençage en phase solide pour identifier les mutations ponctuelles⁶⁴. Les délétions ont été identifiées par rapport à la différence de taille entre le fragment de référence attendu et le fragment muté. Imperiale et al.⁶⁴ ont décrit un panel de 21 mutations situées dans les gènes *K-ras*,
15 APC, et p53 qui permet de détecter 16/31 des cancers invasifs.

D'autres marqueurs ADN utilisés sont la délétion BAT-26, qui est un marqueur d'instabilité des microsatellites et l'ADN hautement amplifiable appelé long ADN (L-ADN), qui n'est pas un marqueur spécifique mais qui semble refléter l'apoptose désordonnée des cellules tumorales exfoliées dans le lumen colique⁶⁵. Ces marqueurs ne
20 sont satisfaisants ni par rapport à leur sensibilité, ni par rapport à leur spécificité.

Comme indiqué précédemment, les altérations de l'ADN peuvent aussi correspondre à une modification du profil de méthylation du gène correspondant au marqueur tumoral d'intérêt. La modification du profil de méthylation peut correspondre à une hypométhylation (diminution du nombre de méthylations) ou à une
25 hyperméthylation (augmentation du nombre de méthylations). Les motifs altérés peuvent être situés dans la partie codant du gène du marqueur tumoral d'intérêt, ou dans les parties 5' et 3' non codant comme la région promotrice ou la région terminatrice de transcription.

L'analyse de la méthylation de l'ADN peut être effectuée en utilisant des
30 techniques basées sur la PCR qualitative et/ou quantitative comme la MSP (methylation-specific PCR), le séquençage bisulfite, la digestion par une enzyme de

restriction sensible aux méthylations couplée avec la PCR, COBRA (combined bisulfite restriction analysis) et Ms-SNuPE (methylation-sensitive single nucleotide primer extension). L'ensemble de ces techniques a été revu en détail et de façon comparée dans un article de méthodologie⁶⁶.

5 Dans la littérature plusieurs gènes hyperméthylés en cas de cancer colorectal ont été rapportés. A titre d'exemple on peut citer le gène ALX4 (Aristaless-like homeobox-4)⁵⁶, la région promotrice du gène TPEF/HHP1 (transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domain)⁶⁷ ou encore le gène Septin-9⁶⁸.

Lorsque, dans le procédé de l'invention, on détecte au moins deux marqueurs,
10 ils peuvent être mis en évidence de façon séparée, par exemple à l'aide de dosages immunoessais différents, ou bien de façon simultanée, en dosage multiplex.

Lorsque, dans le procédé de l'invention, on détecte deux marqueurs de nature différente, par exemple un marqueur protéique et un marqueur ARNm, on peut utiliser deux procédés de détection différents, choisis parmi ceux décrits précédemment. On
15 peut également les détecter simultanément, dans le même milieu de détection et dans les mêmes conditions réactionnelles, comme décrit dans la demande de brevet WO03/104490. Les étapes du procédé de détection décrit dans cette demande de brevet, qui consiste à détecter simultanément des réactions d'hybridation et immunologiques dans un échantillon susceptible de contenir des analytes cibles
20 constitués d'au moins un acide nucléique et d'au moins un autre ligand de nature différente, consistent à :

(i) déposer une quantité connue en volume de l'échantillon dilué dans un tampon de réaction, sur une surface de capture préalablement revêtue des partenaires de capture desdits analytes cibles, lesdits partenaires de capture consistant en au moins
25 une sonde nucléique et au moins un anti-ligand,

(ii) mettre à réagir à une température comprise entre 15°C et 60°C et

(iii) visualiser les réactions d'hybridation et immunologiques ainsi obtenues.

L'échantillon biologique peut nécessiter un traitement particulier car il peut contenir le ou les marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention en
30 tant que tels, ou bien il peut contenir des cellules tumorales circulantes qui contiennent les marqueurs recherchés dans le procédé de l'invention et/ou des cellules tumorales

circulantes qui sont capables de sécréter le ou les marqueurs recherchés dans le procédé de l'invention.

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, l'échantillon biologique est préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans le dit
5 fluide.

Par isoler les cellules tumorales circulantes, on entend obtenir une fraction cellulaire enrichie en cellules tumorales circulantes.

Le traitement de l'échantillon biologique pour isoler les cellules tumorales circulantes peut être effectué par tri cellulaire dans un cytomètre de flux, par
10 enrichissement sur Ficoll, par enrichissement par billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques, ou par toute autre méthode d'enrichissement spécifique connue de l'homme du métier.

Dans le cas du sang à titre d'échantillon biologique, les cellules tumorales circulantes peuvent être isolées grâce à une technique de séparation cellulaire sur Ficoll
15 associée à une déplétion des cellules sanguines utilisant des anticorps anti-CD45 couplés à des billes magnétiques (DynaL Biotech ASA, Norvège).

La détection du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention peut alors être effectuée directement à partir de cellules tumorales circulantes isolées de l'échantillon biologique, par exemple par marquage
20 immunocytochimique de ces cellules avec un anticorps anti-marqueur(s) tumoral(aux) recherché(s) dans le procédé de l'invention, après avoir déposé les cellules tumorales circulantes sur une lame par cytopspin. La détection du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention peut également être effectuée directement dans les cellules tumorales circulantes en utilisant la méthode de cytométrie de flux
25 telle que décrite dans Métézau et al.⁶⁹.

Dans ces conditions, lesdites cellules circulantes peuvent être traitées dans des conditions permettant le blocage du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention à l'intérieur desdites cellules. Un tel traitement est décrit par Mathieu et al.⁷⁰.

30 La détection du ou des marqueurs tumoraux recherchés dans le procédé de l'invention se fait alors après avoir rendu perméable la membrane des cellules pour

faire rentrer les partenaires de liaison spécifique du ou des marqueurs recherchés dans le procédé de l'invention.

La détection directe du ou des marqueurs tumoraux utilisés dans le procédé de l'invention à partir des cellules circulantes peut également être effectuée à l'aide d'un procédé ELISPOT, par exemple à l'aide du procédé décrit dans la demande de brevet
5 WO03/076942 déposée par la Demanderesse. Ce procédé est un procédé de détection et/ou quantification de cellules tumorales circulantes d'un échantillon biologique, lesquelles sont capables de relarguer ou sécréter *in vitro* un ou plusieurs marqueurs tumoraux, comprenant les étapes consistant à :

10 (i) déposer une quantité desdites cellules au fond d'une surface de culture sur laquelle est fixé au moins un partenaire de liaison spécifique dudit ou desdits marqueurs tumoraux,

(ii) cultiver lesdites cellules en conditions telles qu'elles relarguent ou sécrètent lesdits marqueurs tumoraux qui sont immunocapturés au fond de la surface de culture,

15 (iii) éliminer les cellules par lavage,

(iv) ajouter au moins un conjugué marqué spécifique desdits marqueurs tumoraux et

(v) visualiser le marquage ainsi obtenu.

La détection directe du ou des marqueurs tumoraux utilisés dans le procédé de l'invention dans les cellules tumorales peut encore être effectuée dans le milieu de culture desdites cellules après les avoir cultivées dans des conditions telles qu'elles sécrètent du ou des marqueurs tumoraux utilisés dans le procédé de l'invention.

Les conditions de culture pour le relargage ou l'expression des marqueurs tumoraux sont des conditions classiques telles que 37°C sous atmosphère humide et à
25 5% de CO₂.

Lorsque l'échantillon biologique est un échantillon solide, la présence du ou des marqueurs tumoraux peut également être montrée *in vivo*, *in situ* dans les tumeurs.

Pour montrer la présence d'un marqueur tumoral au sein d'une tumeur *in vivo*, on peut utiliser toute méthode d'imagerie connue de l'homme du métier. Pour cela, on
30 peut coupler un partenaire de liaison dudit marqueur tumoral à un traceur d'imagerie.

Par couplage des partenaires de liaison à un traceur d'imagerie, on entend la

fixation d'un traceur capable d'être détecté par toute méthode d'imagerie connue de l'homme du métier, et de générer directement ou indirectement un signal détectable. Ainsi, le traceur peut être un traceur radioactif comme le technétium-99. Dans ce cas, l'organe atteint du cancer primitif ou des métastases va fixer le marqueur tumoral et son traceur. Le rayonnement émis par l'organe peut être filmé par une caméra spéciale, par exemple une gamma-caméra. L'appareil recueille les scintillations générées par la substance radioactive et permet ainsi de visualiser l'organe.

Dans un autre procédé de l'invention, le traceur peut comprendre un corps radioactif émettant des positrons (Fluor 18). Les images seront ensuite acquises par un système de Tomographie par Émission de Positrons.

Dans un autre procédé préféré de l'invention, le partenaire du ou des marqueurs tumoraux peut être couplé à des nanoparticules. A titre d'exemple, il peut s'agir de nanoparticules supramagnétiques. Par exemple des nanoparticules magnétiques anioniques pour l'application au marquage cellulaire direct et la détection *in vivo* par imagerie par résonance magnétique nucléaire. Il peut également s'agir de nanoparticules d'or.

Grâce aux procédés de l'invention permettant la détection du marqueur tumoral *in vivo*, on pourra visualiser les zones de l'organisme où il y a eu fixation du partenaire de liaison du marqueur tumoral, les cancers produisant du marqueur tumoral, et en particulier le cancer colorectal, ainsi que les localisations de leurs métastases à distance et les atteintes ganglionnaires.

Le procédé de l'invention peut être utilisé tant pour le diagnostic précoce, que pour le dépistage, le suivi thérapeutique, le pronostic et le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer colorectal puisque seules les cellules cancéreuses sécrètent de la Plastine-I et que cette production est fonction du grade du cancer, ce qui constitue un autre objet de l'invention.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés à titre illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 à 21 annexées, sur lesquelles :

- la figure 1 est un graphe relatif au dosage par ELISA du LEI, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),

- la figure 2 est un graphe relatif au dosage par ELISA de l'Ezrine, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 3 est un graphe relatif au dosage par ELISA de l'Aminoacylase 1, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- 5 - la figure 4 est un graphe relatif au dosage par ELISA du L-FABP, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 5 est un graphe relatif au dosage par ELISA du I-FABP, en pg/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- 10 - la figure 6 est un graphe relatif au dosage par ELISA de l'Apolipoprotéine AI, en µg/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-), soit en microplaque ELISA (figure 6A), soit avec le kit Lincoplex (figure 6B),
- la figure 7 est un graphe relatif au dosage par le kit multiplex de Linco de
- 15 l'Apolipoprotéine AII, en µg/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 8 est un graphe relatif au dosage par ELISA de la Plastine-I, en RFV (Relative Fluorescence Value), dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- 20 - la figure 9 est un graphe relatif au dosage par ELISA de la bêta2 Microglobuline, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 10 est un graphe relatif au dosage par ELISA d'ACE, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- 25 - la figure 11 est un graphe relatif au dosage par ELISA du CA 19-9, en U/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 12 est un graphe relatif au dosage par ELISA de la Testostérone, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),

- la figure 13 est un graphe relatif au dosage par ELISA de la E-Cadhérine, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 14 est un graphe relatif au dosage par ELISA de la PAP1, en ng/ml, dans le
5 sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 15 est un graphe relatif au dosage par ELISA de la Galectine-3, en RFV, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 16 est un graphe relatif au dosage par ELISA de la LDH, en ng/ml, dans le
10 sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 17 est un graphe relatif au dosage par ELISA du Protéasome 20S, en ng/ml, dans le sérum de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 18 est un graphe relatif au dosage par ELISA d'Aminoacylase 1, en ng/ml,
15 dans les selles de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- la figure 19 est un graphe relatif au dosage par ELISA de Galectine-3, en RFV, dans les selles de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-),
- 20 - la figure 20 est un graphe relatif au dosage par ELISA de Protéasome 20S, en RFV, dans les selles de patients présentant un cancer colorectal (CCR+) et de patients sains (CCR-), et
- la figure 21 est une représentation graphique d'un dosage ELISPOT du LEI, de l'Ezrine et de la Galectine-3, en nombre de spots par 10^6 cellules cancéreuses des
25 lignées Caco-2, HT-29 et HT29-B6.

Exemple 1 : Clonage des gènes codant pour les marqueurs tumoraux et expression des protéines recombinantes

1. Amplification de l'ADNc et clonage

- 30 La lignée de cancer colorectal Caco-2 est cultivée dans le milieu DMEM contenant 2 mM de L-Glutamine, sans SVF (sérum de veau fœtal) (tous Gibco).

Pour le clonage des gènes LEI, L-FABP et Gal-3, les ARN messagers ont été extraits à partir d'un culot de 10^8 cellules Caco-2 en utilisant le kit FastTrack 2.0 de Invitrogen (Cat. No. 45-0019), en suivant le protocole fourni par le fabricant. Les étapes de transcription inverse et de PCR sont réalisées en une seule fois à partir de 450 ng d'ARNm Caco-2, avec le kit Superscript III One Step RT-PCR System (Invitrogen Cat. No. 12574-018) utilisant l'enzyme Platinum Taq DNA polymérase en suivant le protocole fourni par le fabricant. Les amorces de PCR utilisées pour l'amplification des gènes sont données dans le Tableau 1.

Tableau 1.

Gènes et Amorces	Oligonucléotides
<i>LEI</i>	
OL215 (SEQ ID°1)	5'-ATGGAGCAGCTGAGCTCAGCAAAC-3'
OL216 (SEQ ID°2)	5'-CTAAGGGGAAGAAAATCTCCCCAA-3'
<i>L-FABP</i>	
Forward (SEQ ID°3)	5'-CGGAGCGTCTCCCATGAGTTTCTCCGGCAAGTA-3'
Reverse (SEQ ID°4)	5'-GAAATGCAGACTTGTCTAGATGCGCTTGCTGATGCGCTTGAAGACAATG-3'
<i>Gal-3</i>	
OL217 (SEQ ID°5)	5'-ATGGCAGACAATTTTTCGCTCC-3'
OL218 (SEQ ID°6)	5'-TTATATCATGGTATATGAAGCACTGG-3'

10

Les fragments d'ADN obtenus ont été clonés dans le vecteur pCR2.1 TOPO (LEI et Gal-3) avec le TA Cloning kit (Invitrogen Cat. No. K4520-01) ou le vecteur pCMV6-XL4 d'Origene (L-FABP) après digestion par Bsm BI et Xba I. Les plasmides ont été séquencés afin de vérifier que l'ADNc est bien conforme à la séquence attendue.

15

Pour le clonage du gène codant pour l'Aminoacylase 1, les ARN totaux ont été extraits à partir d'un culot de 10^8 cellules Caco-2 en utilisant le kit RNA Easy Mini de Qiagen, en suivant le protocole fourni par le fabricant. La transcription inverse est réalisée à partir de 10 ng de ARN Caco-2, avec l'enzyme Superscript II (Invitrogen) en suivant le protocole fourni par le fabricant. L'amorce de transcription inverse est un oligo(dT).

20

L'ADNc issu de cette réaction a été utilisé comme matrice dans une réaction de PCR utilisant le kit AccuPrime Pfx (Invitrogen Cat. No. 12344-024) en suivant le protocole fourni par le fabricant. Les amorces de PCR sont : ACY-1 Fwd2 (SEQ ID°7 :

5'-GCGAATTCTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGAGCAAAGGTCCGGAA
GAGGAGCACCCATCG-3') et ACY-1 Rev (SEQ ID°8 :
5'-GCAAGCTTCAGCTGTCACTGGGCAGGGC-3')

Dans ces conditions, il a été possible d'amplifier un fragment de 1,3 kb qui a été
5 cloné dans un vecteur de clonage de type Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit
(Invitrogen Cat. No. K2820-20). Ce plasmide a été séquencé afin de vérifier que
l'ADNc est bien conforme à la séquence attendue.

Le fragment d'ADN suivant (SEQ ID°9) contenant le cadre de lecture ouvert *I-
FABP* a été obtenu par synthèse chimique, effectué par la société Genart.

10 SEQ ID°9 :
GGTACCGAATTCCGCGTTTGACAGCACTTGGAAGGTAGACCGGAGTGAAAA
CTATGACAAGTTCATGGAAAAAATGGGTGTTAATATAGTGAAAAGGAAGCT
TGCAGCTCATGACAATTTGAAGCTGACAATTACACAAGAAGGAAATAAATT
CACAGTCAAAGAATCAAGCGCTTTTCGAAACATTGAAGTTGTTTTTGAAGTT
15 GGTGTCACCTTTAATTACAACCTAGCAGACGGAAGTGAAGTCAAGGGGGACC
TGGAGCCTTGAGGGAAATAAACTTATTGGAAAATTCAAACGGACAGACAAT
GGAAACGAACTGAATACTGTCCGAGAAATTATAGGTGATGAAGTACTAGTCCAG
ACTTATGTGTATGAAGGAGTAGAAGCCAAAAGGATCTTTAAAAAGGATTCT
AGAGTCGACGAGCTC

20 2. Construction des vecteurs d'expression

Les gènes codant pour le LEI et la Galectine-3 ont été sous-clonés dans le
vecteur d'expression procaryote pMR78⁷¹ et le gène de L-FABP dans le vecteur pET3d
(New England Biolabs). Les sites de restriction nécessaire au clonage ont été introduits
par PCR en utilisant comme matrice les plasmides pCR2.1 TOPO-LEI, pCR2.1 TOPO-
25 Gal-3 et pCMV6-LFABP. L'enzyme de PCR est la Pfu DNA polymérase de Promega,
la réaction de PCR a été réalisée selon les instructions du fabricant avec les amorces
données dans le Tableau 2.

Tableau 2

Gènes et Amorces	Oligonucléotides
<i>LEI</i>	
OL228 (SEQ ID°10)	5'-ATGGGAATTCAGGAGCAGCTGAGCTCAGCAA-3'
OL229 (SEQ ID°11)	5'-CGATAAGCTTAAGGGGAAGAAAATCTCCCC-3'

L-FABP

Forward (SEQ ID°12) 5'-GCTGGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCA
TCACATGAGTTTCTCCGGCAAGTACCAAC-3'

Reverse (SEQ ID°13) 5'-GCACGGATCCTAGATGCGCTTGCTGATGCGCTTG
AAGAC-3'

Gal-3

OL230 (SEQ ID°14) 5'-ATGGGAATTCAGGCAGACAATTTTTCGCTCC-3'

OL231 (SEQ ID°15) 5'-CGATAAGCTTATATCATGGTATATGAAGCACTG
G-3'

Les produits de PCR contenant les cadres de lecture ouverts codant pour le LEI ou la Galectine-3 ont été digérés par les enzymes de restriction Eco RI et Hind III. Les fragments ont été introduits dans le vecteur pMR78 restreint par les mêmes enzymes
5 (plasmides pMR-LEI et pMR-Gal-3). Le vecteur pMR78 contient une séquence 6-histidine en phase avec la protéine à exprimer qui permet la purification par chromatographie d'affinité métal-chélate. Le produit de PCR L-FABP a été cloné dans le vecteur pET3d, au niveau des sites de restriction Nco I et Bam HI.

Pour l'Aminoacylase 1, le vecteur de clonage TOPO a été directement digéré
10 par les enzymes de restriction Eco RI et Hind III afin de générer un fragment de 1,3 kb contenant le cadre de lecture ouvert *acy1*, qui a été introduit dans le vecteur pStaby1 (Eurogentec). Le plasmide recombinant est appelé pStaby1-ACY.

Pour la I-FABP, le vecteur de clonage fourni par Geneart a été digéré par les enzymes de restriction Eco RI et Sal I afin de générer un fragment d'environ 400 pb
15 contenant la séquence codante qui a été introduite dans le vecteur pMRCH79 (dérivé du vecteur pMR78, bioMérieux). Le plasmide recombinant est appelé pMRCH-IFABP.

Les plasmides pGEX-Ezrine et pGEX-Plastine-I, permettant d'exprimer respectivement l'Ezrine et la Plastine-I en fusion avec la GST (Glutathione S-transférase), ont été fournis par l'Institut Curie.

20

3. Expression et purification des protéines recombinantes

Les plasmides d'expression permettant de produire les marqueurs tumoraux recombinants sont introduits dans des bactéries E. coli BL21 et dérivées (Stratagene). Les cultures sont réalisées à température ambiante sous agitation. Les conditions de
25 culture précises pour chaque protéine sont récapitulées dans le Tableau 3. L'IPTG est

l'isopropyl beta-D-1-thiogalactosidase.

Les culots bactériens sont repris en tampon PBS 2X (phosphate buffered saline) et passé dans un désintégrateur de cellules à 1,5 kbar (Constant System). Les lysats sont centrifugés à 3000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant contient les protéines solubles. Le culot contient les corps d'inclusion. Le tampon de solubilisation des corps d'inclusion dépend de la protéine.

Pour le LEI, la purification se fait à partir de la fraction soluble, sur une colonne contenant 5 mL de résine Ni-NTA-Sepharose (Qiagen) et la protéine est éluée avec du PBS 2X contenant de l'imidazole 450 mM, pH 7,5.

Pour la Galectine-3, les corps d'inclusions sont solubilisés en PBS 2X, urée 1M, passés sur 5 mL de résine Ni-NTA-Sepharose (Qiagen) et la protéine Gal-3 est éluée avec du PBS 2X contenant de l'imidazole 450 mM, urée 1M pH 7,5.

Pour la L-FABP, la purification se fait à partir de la fraction soluble, en utilisant le kit Ni-IDA de Macherey-Nagel.

Tableau 3

	Souche	Volume Culture	Induction IPTG	Purification
LEI	BL21	250 mL	0,1 mM	Ni-NTA
Gal-3	BL21-Codon plus (DE3)-RIPL	400 mL	0,5 mM	Ni-NTA
L-FABP	BL21	500 mL	0,1 mM	Ni-IDA
GST-Ezrin	BL21	250 mL	0,1 mM	GST
ACY-1	BL21-Codon plus (DE3)-RIPL	500 mL	0,1 mM	Autre

Pour la GST-Ezrine, la purification se fait à partir des corps d'inclusions solubilisés dans le tampon Tris 100 mM, urée 8M, DTT 10 mM par chromatographie d'affinité GST. On utilise une colonne contenant 5 mL de gel Glutathione Sepharose 4 fast flow (Amersham). Le tampon d'équilibration et de lavage est du PBS 2x, Tween 20 0,05%. Le tampon d'élution est du Tris-HCl 50 mM, glutathione réduite 20 mM, pH 8.

Pour l'Aminoacylase 1, la fraction soluble de la culture est passée sur une colonne Amersham HiTrap Q FF et la protéine ACY-1 a été éluée avec 0.3M NaCl à pH 7,5. Comme plusieurs autres protéines ont été co-éluées dans ces conditions, la

purification a été poursuivie sur une colonne à interaction hydrophobe (HIC Phenyl HP, Amersham). La protéine ACY-1 a été éluée par 0,5M NaCl à pH 7.

La protéine recombinante GST-Plastine-I a été fournie par l'Institut Curie sous forme purifiée.

5 La protéine recombinante Calréticuline a été produite par la société Proteus Services for Industry (Dijon, France). La séquence codant pour la Calréticuline a été obtenue par synthèse chimique.

Exemple 2 : Obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre les marqueurs

10 tumoraux

1. Modèle animal

Les expériences d'immunisation ont été réalisées chez des souris BALB/c (H-2^d) femelles âgées de 6 à 8 semaines au moment de la première immunisation.

2. Immunogènes et immunisations

15 Afin d'augmenter les réponses immunes obtenues chez les souris et pouvoir générer des anticorps monoclonaux, les marqueurs tumoraux ont été produits sous forme de protéines recombinantes produites selon les modes opératoires décrits dans l'exemple 1. La protéine LDH a été obtenue auprès de la société SciPac (Cat. No. 103-133). Ces protéines ont été mélangées volume pour volume avec l'adjuvant de Freund
20 (Sigma), préparé sous forme d'émulsion eau-dans-huile et dont il est connu qu'il présente un bon pouvoir immunogène. Pour chaque marqueur tumoral, 3 souris ont été immunisées. Les souris ont reçu 3 doses successives de 10 µg des immunogènes à 0, 2 et 4 semaines. Toutes les injections ont été réalisées par voie sous-cutanée. La première injection est faite en mélange avec l'adjuvant de Freund complet, les deux suivantes se
25 font en mélange avec l'adjuvant de Freund incomplet. Entre J50 et J70 après la première injection, les réponses humorales ont été restimulées avec une injection intraveineuse de 100 µg de la protéine recombinante.

3. Suivi de l'apparition de la réponse humorale

Afin de suivre l'apparition des anticorps, on effectue régulièrement sur les
30 souris des prélèvements de sang. La présence des anticorps anti-marqueur tumoral est testée en utilisant un ELISA. La protéine d'intérêt est utilisée en capture (1 µg/puits),

après saturation on fait réagir avec l'antigène différentes dilutions des sérums à tester (incubation à 37°C, pendant 1h). Les anticorps spécifiques présents dans le sérum sont révélés par un anticorps de chèvre anti-IgG de souris AffiniPure conjugué à la phosphatase alcaline (H+L, Jackson Immunoresearch, Cat no. 115-055-146), qui se lie
5 aux anticorps recherchés (0,1 µg/puits).

4. Obtention d'anticorps monoclonaux

Trois jours après la dernière injection, pour chaque marqueur tumoral, une des souris immunisée a été sacrifiée ; le sang et la rate ont été prélevés. Les splénocytes obtenues à partir de la rate ont été mises en culture avec les cellules de myélome Sp2/0-Ag14 pour qu'elles fusionnent et s'immortalisent, selon le protocole décrit par Köhler et Milstein^{72,73}. Après une période d'incubation de 12-14 jours les surnageants des hybridomes obtenus ont été criblés pour déterminer la présence d'anticorps anti-marqueur tumoral en utilisant le test ELISA décrit dans le point 3 de cet exemple. Lorsque des protéines de fusion GST ont été utilisées comme immunogène, les clones
10 dirigés contre la GST sont éliminés en effectuant un criblage ELISA avec en capture la GST non couplée. Les colonies d'hybridome positives ont été sous-clonées deux fois selon la technique de la dilution limite, bien connue par l'homme du métier.

5. Caractérisation des anticorps monoclonaux par immunoblot

La liste des anticorps monoclonaux obtenus contre les différents marqueurs tumoraux est présentée dans le Tableau 4. Ces anticorps monoclonaux ont été analysés
20 par la technique du Western blot.

Tableau 4

Marqueurs Tumoraux	Nom des Anticorps Monoclonaux
Leucocyte Elastase Inhibitor (LEI)	21B10A5 et 10E1H1
Ezrine	4A7A6C1 et 4A9H5
Aminoacylase 1	2A7F6 et 11H7D9
Plastine-I	3D11D10, 8C8C5, 3A3H2, 8G2D2
Calréticuline	5C10H10 et 11B6D11
L-lactate déshydrogénase chaîne B (LDH)	3F11E11 et 12F10G8
Galectine-3	12F8A12 et 14A5G1

5.1. Méthodologie

25 Les extraits de culture cellulaires de lignées Caco-2 et HT-29 sont préparés en lysant directement le culot cellulaire par 600 µl d'une solution en eau d'urée 8,3M,

thiourée 2M, sulfonate de 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane (CHAPS) 4%, DTT 100 mM, Servalyte 4-9 (Serva, Heidelberg, Allemagne) 2%, Orange G 0.1g/l, puis traités selon le protocole de préparation d'échantillon des gels NuPAGE Novex (Invitrogen). Pour obtenir les extraits de tissu, les biopsies tumeur et muqueuse des patients GHBD001, GHBD004 et CLSP109 ont été dissociées au scalpel, puis ont subi 10 cycles d'extraction dans le système Medimachine (Becton Dickinson) en utilisant des Medicons 50 µm avec 1 ml de tampon PBS, 2,5 mM EDTA, inhibiteurs des protéases (pastilles Roche). Ces 10 ml de suspension cellulaire sont poolés, complétés à 25 ml puis centrifugés 15 min à 600g. Le surnageant correspond à l'extrait de tissu qui est traité selon le protocole de préparation d'échantillon des gels NuPAGE Novex. On utilise des échantillons réduits, à une concentration finale en protéine totale de 0,4 mg/ml. Le volume de dépôt est de 20 µl par puits, sur un gel NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12%, tampon de migration MOPS. Après migration (sous 200V, pendant 1 heure) et transfert sur membrane de PVDF (sous 400 mA, pendant 45 min), la qualité du transfert est appréciée par une coloration à l'amidoblack.

Les membranes sont saturées par 5% de lait écrémé (Régilait) dans une solution de TNT (Tris 15 mM, NaCl 0,14M, Tween 20 0,5% pH8) à température ambiante pendant 1 heure. Après saturation, les membranes sont incubées pendant 1 heure avec les différents anticorps à tester dilués à 10 µg/ml dans la solution de saturation. Après rinçages au TNT, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec un conjugué anti-souris-peroxydase de raifort dilué au 1 : 5000, (Cat No. 115-035-062, Jackson ImmunoResearch) dans la solution de saturation. Après rinçage, la révélation est réalisée avec le kit Substrat Supersignal West Dura Extended (Cat No. 34076, Pierce) suivant les données d'utilisation recommandées.

Le signal de chemiluminescence sur les membranes a été mesuré avec le système d'imagerie VersaDoc de Biorad. A partir de l'image du Western blot, les volumes des bandes qui correspondent aux différents marqueurs tumoraux ont été évalués avec le logiciel QuantityOne (Bio-Rad). Le volume correspond à l'intensité du signal de chemiluminescence multipliée par la surface de la bande.

5.2. Résultats

Les résultats de Western blot récapitulés dans le Tableau 5 qui donne le volume

des bandes correspondant au marqueur tumoral d'intérêt sur les analyses par Western blot, en fonction des différents échantillons testés. Ces résultats montrent que les marqueurs tumoraux testés sont bien exprimés par les lignées de cancer du côlon Caco-2 et HT-29, ainsi que dans les tissus, comme montré avec les extraits de tumeur et muqueuse, obtenus à partir des patients. L'intensité du signal obtenu avec un anticorps sur un échantillon peut être comparée aux signaux obtenus avec les autres échantillons et le même anticorps. La technique utilisée permet de confirmer la présence ou l'absence du marqueur dans le tissu (échantillon non distant) et la spécificité des anticorps vis-à-vis des marqueurs. Cette technique n'a pas été mise en œuvre dans cet exemple dans les échantillons distants car elle ne permettrait pas de conclure à la présence ou non du marqueur tumoral dans les échantillons distants, ni de déterminer si sa concentration sera augmentée ou diminuée dans ceux-ci. De plus, le schéma expérimental utilisé ne permet pas de comparer la réactivité d'un anticorps à l'autre.

Tableau 5

Marqueur tumoral et Anticorps	Caco-2	HT-29	Tissu tumeur GHBD001	Tissu muqueuse GHBD004	Tissu tumeur GHBD004	Tissu muqueuse CLSP109	Tissu tumeur CLSP109
<i>LEI</i>							
21B10A5	8365	7678	NT	60200	36506	NT	NT
10E1H1	0	0	NT	13357	6893	NT	NT
<i>Ezrine</i>							
4A9H5	7066	4742	NT	NT	NT	1588	2446
4A7A6C1	123436	116448	42480	15303	67439	NT	NT
<i>Aminoacylase 1</i>							
2A7F6	10687	4787	NT	NT	NT	4477	7238
11H7D9	217664	232005	36093	10513	30233	NT	NT
<i>Plastine-I</i>							
3D11D10	136725	NT	NT	NT	NT	275477	246564
8C8C5	557	1110	4364	77	0	NT	NT
<i>Calréticuline</i>							
5C10H10	2842	3040	NT	NT	NT	2503	3294
11B6D11	3261	2937	NT	NT	NT	2070	2764
<i>LDH</i>							
3F11E11	45391	NT	NT	NT	NT	30411	13942
12F10G8	122907	154593	11841	15811	53285	NT	NT
<i>Galectine-3</i>							
12F8A12	245712	65790	18262	12961	7307	NT	NT
14A5G1	254531	120010	79833	98361	45872	NT	NT

15 NT: non testé.

5.3. Anticorps monoclonaux dirigés contre la Plastine-I

Chez le patient GHBD004, l'anticorps 8C8C5 n'allume pas ou que très faiblement la bande qui correspond à la Plastine-I. La présence de Plastine-I dans ces échantillons peut être mise en évidence en utilisant par exemple l'anticorps 8G2D2 qui présente une meilleure affinité pour la Plastine-I en blot.

Comme la Plastine-I est membre d'une famille de protéines comprenant 2 autres isoformes (Plastines L et T) avec lesquels elle présente plus de 70% d'homologie, nous avons testé l'ensemble des clones d'anticorps monoclonaux obtenus pour leur réactivité vis-à-vis des protéines GST-Plastine-L et GST-Plastine-T (fournies par l'Institut Curie). A l'issue de ce criblage, nous avons sélectionné les clones 3D11D10, 8C8C5, 3A3H2 et 8G2D2 qui ne présentent pas de réactivité croisée avec les autres membres de la famille. Ces anticorps sont bien spécifiques de l'isoforme Plastine-I.

15 Exemple 3 : Dosages sériques des marqueurs tumoraux

1. Patients et prélèvements

La collecte des échantillons de sang se fait au niveau d'un réseau de 8 centres cliniques répartis dans toute la France, dans le cadre de 2 protocoles loi Huriet.

Pour l'obtention de sérum, le prélèvement sanguin se fait sur tube sec. Pour l'obtention du plasma, le prélèvement sanguin se fait sur tube EDTA. Après coagulation, le tube est centrifugé 10 min à 1000 g, le sérum est prélevé, aliquoté et conservé à -80°C. Le tube de plasma est directement centrifugé 10 min à 1000 g, le plasma est prélevé, aliquoté et conservé à -80°C. Les échantillons sont parfaitement documentés pour l'histoire clinique des patients.

25 2. Dosage sérique du marqueur tumoral LEI

La protéine LEI a été dosée à l'aide des anticorps décrits dans l'exemple 2 et d'un test ELISA utilisant l'automate Vidas® (bioMérieux). Pour ce faire, le test ELISA a été construit en utilisant les réactifs du kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. No. 30315). Les réactifs ont été utilisés tels que décrits dans la notice correspondante (réf. 11728 D – FR – 2005/05), avec les modifications suivantes :

1. Les cônes ont été sensibilisés avec l'anticorps de capture 10E1H1 à une

concentration de 10 µg/ml.

2. Le contenu du deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra a été remplacé par 300 µl d'anticorps de révélation 21B10A5, couplé à la biotine, dilué à 1 µg/ml dans le tampon du deuxième puits du kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampon avec
5 sérum de chèvre et azoture de sodium à 1 g/l).
3. Les échantillons de sérum, de plasma ou de selle (50µl) ont été dilués directement dans le deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra, pur ou après une dilution préalable au 1/20 dans le tampon du deuxième puits du kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampon avec sérum de chèvre et azoture de sodium à 1 g/l).
- 10 4. La réaction ELISA a été réalisée à l'aide de l'automate Vidas® et du protocole du kit HBs Ag Ultra.
5. Les résultats ont été obtenus sous forme de valeurs brutes après soustraction du bruit de fond (lecture du substrat avant réaction).

Une courbe étalon a été établie en dosant une gamme de concentrations du
15 marqueur tumoral sous forme de protéine recombinante. La courbe étalon a été tracée en reportant en abscisse la concentration du marqueur tumoral et en ordonnée le signal lu par Vidas® (RFV ou Relative Fluorescence Value). La concentration de marqueur tumoral présente dans le fluide corporel à doser (sang, sérum, plasma, selle) a été calculée en reportant la concentration correspondant au signal RFV lu par Vidas®.

20 Les doses obtenues pour les patients analysés sont reportées sur la Figure 1. On peut noter sur cette figure que 3 sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade IV et 1 sérum de patient ayant un cancer colorectal de stade III montrent une nette augmentation de leur dose de LEI sérique.

3. Dosage sérique du marqueur tumoral Ezrine

25 La protéine Ezrine a été dosée à l'aide des anticorps décrits dans l'exemple 2 et d'un test ELISA utilisant l'automate Vidas® (bioMérieux). Pour ce faire, le test ELISA a été construit en utilisant les réactifs du kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. No. 30315). Les réactifs ont été utilisés tels que décrits dans la notice correspondante (réf. 11728 D – FR – 2005/05), avec les modifications suivantes :

- 30 1. Les cônes ont été sensibilisés avec l'anticorps de capture 4A9H5 à une concentration de 30 µg/ml.

2. Le contenu du deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra a été remplacé par 300 µl d'anticorps de révélation 4A7A6C1, couplé à la biotine, dilué à 1 µg/ml dans le tampon du deuxième puits du kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampon avec sérum de chèvre et azoture de sodium à 1 g/l).

5 3. Les échantillons de sérum, de plasma ou de selle (50µl) ont été dilués directement dans le deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra.

4. La réaction ELISA a été réalisée à l'aide de l'automate Vidas® et du protocole HBS AG ULTRA dont l'étape d'incubation de l'échantillon avec les anticorps de capture et de révélation avait été portée à 100 cycles.

10 5. Les résultats ont été obtenus sous forme de valeurs brutes après soustraction du bruit de fond (lecture du substrat avant réaction).

La concentration du marqueur tumoral présente dans le fluide corporel à doser (sang, sérum, plasma, selle) a été calculée selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 2 concernant le dosage du LEI.

15 Les doses obtenues pour les patients analysés sont reportées sur la Figure 2. On peut noter sur cette figure que 3 sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade IV montrent une nette augmentation de leur dose d'Ezrine sérique.

4. Dosage sérique du marqueur tumoral Aminoacylase 1

20 La protéine Aminoacylase 1 a été dosée à l'aide des anticorps décrit dans l'exemple 2 et d'un test ELISA utilisant l'automate Vidas® (bioMérieux). Pour ce faire, le test ELISA a été construit en utilisant les réactifs du kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. No. 30315). Les réactifs ont été utilisés tels que décrits dans la notice correspondante (réf. 11728 D – FR – 2005/05), avec les modifications suivantes :

25 1. Les cônes ont été sensibilisés avec l'anticorps de capture 2A7F6 à une concentration de 20 µg/ml.

2. Le contenu du deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra a été remplacé par 300 µl d'anticorps de révélation 11H7D9, couplé à la biotine, dilué à 1 µg/ml dans le tampon du deuxième puits du kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampon avec sérum de chèvre et azoture de sodium à 1 g/l).

30 3. Les échantillons de sérum, de plasma ou de selle (100 µl) ont été dilués directement dans le deuxième puits de la cartouche HBS Ag Ultra.

4. La réaction ELISA a été réalisée à l'aide de l'automate Vidas® et du protocole HBS AG ULTRA dont l'étape d'incubation de l'échantillon avec les anticorps de capture et de révélation avait été portée à 100 cycles.

5. Les résultats ont été obtenus sous forme de valeurs brutes après soustraction du
5 bruit de fond (lecture du substrat avant réaction).

La concentration du marqueur tumoral présente dans le fluide corporel à doser (sang, sérum, plasma, selle) a été calculée selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 2 concernant le dosage du LEI.

Les doses obtenues pour les patients analysés sont reportées sur la Figure 3. On
10 peut noter sur cette figure que 1 sérum de patients ayant un cancer colorectal de stade II, 1 sérum de patients ayant un cancer colorectal de stade III et 2 sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade IV montrent une nette augmentation de leur dose d'Aminoacylase 1 sérique.

5. Dosage sérique du marqueur tumoral L-FABP

15 Nous avons utilisé un kit ELISA commercialisé par la société Hycult biotechnology pour doser la protéine L-FABP humaine (Cat. No. HK404). Ce kit permet de quantifier la protéine L-FABP dans les surnageants de culture cellulaire, dans le sérum, le plasma ou l'urine, afin de déterminer la présence de lésions au niveau hépatique. Nous avons suivi le mode opératoire préconisé par le fabricant avec 2
20 modifications : les incubations ont été effectuées à 37°C et non à température ambiante, les sérums ont été dilués au 1/10e avant le dosage. Le dosage de la protéine L-FABP peut être effectué par des techniques alternatives, bien connues des hommes du métier.

La Figure 4 présente les résultats de ce dosage. Dans le panel de sérum que nous avons testé, 41 patients sur 141 ayant un cancer colorectal ont une concentration
25 sérique de L-FABP supérieure à 17 ng/ml, alors que dans le groupe témoin, aucun sujet ne dépasse cette valeur. Parmi ces 41 patients, on retrouve 8 patients ayant un cancer colorectal de stade I, 8 ayant un cancer colorectal de stade II, 13 ayant un cancer colorectal de stade III et 12 ayant un cancer colorectal de stade IV. La concentration moyenne de L-FABP sérique observée pour 141 patients avec un cancer colorectal est
30 de $16,6 \pm 1,3$ ng/ml. La valeur moyenne est de $6,6 \pm 0,2$ ng/ml pour 112 individus sains (témoins négatifs). Cette différence est statistiquement significative ($P < 0,0001$, t -test

unilatéral avec correction de Welch pour variances inégales).

6. Dosage sérique du marqueur tumoral I-FABP

Nous avons utilisé un kit ELISA commercialisé par la société Hycult biotechnology pour doser la protéine I-FABP humaine (Cat. No. HK406). Ce kit
5 permet de quantifier la protéine I-FABP dans les surnageants de culture cellulaire, dans le sérum, le plasma ou l'urine, afin de déterminer la présence de lésions ischémiques au niveau de l'intestin grêle. Nous avons suivi le mode opératoire préconisé par le fabricant. Le dosage de la protéine I-FABP peut être effectué par des techniques alternatives, bien connues des hommes du métier.

10 La figure 5 présente les résultats de ce dosage. Dans le panel de sérum que nous avons testé, 15 patients sur 40 ayant un cancer colorectal ont une concentration sérique d'I-FABP supérieure à 40 pg/ml, alors que dans le groupe témoin uniquement 2 sujets sur 24 dépassent cette valeur. Plus nettement, 3 sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade I, 2 sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade III et 1
15 sérum de patient ayant un cancer colorectal de stade IV ont une concentration sérique d'I-FABP supérieure à 100 pg/ml. Aucune concentration supérieure à cette valeur n'a été trouvée dans le groupe témoin CCR-.

7. Dosage sérique du marqueur tumoral Apolipoprotéine AI

Le dosage de l'Apolipoprotéine AI sérique a été réalisé par deux techniques
20 différentes d'immunoessai. Dans un premier temps, nous avons utilisé un ELISA sandwich en microplaque. Les plaques 96 puits ont été coatées avec l'anticorps monoclonal anti-Apo AI Clone 1404 (Biodesign Cat. No. H45404) à 1µg par puits. Après 3 lavages PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), les plaques sont saturées par 10% de lait dans du PBS-T pendant 1h à 37°C. On lave encore 3 fois en PBS-T, on dépose sur
25 les plaques 100 µl des dilutions de la gamme étalon ou 100 µl de la dilution au 1/100 000 des échantillons de sérum à tester, et on incube 2h à 37°C. La gamme étalon est réalisée en diluant la protéine Apo AI (Biodesign Cat. No. A50620H) dans du PBS-T, BSA 1% (1,6 à 100 ng/ml). Après 3 lavages PBS-T, l'anticorps de détection polyclonal couplé à la peroxydase de raifort (Biodesign Cat. No. K45452P) est rajouté
30 à 0,1 µg par puits et on incube 2h à 37°C. On effectue encore 3 lavages PBS-T, avant de rajouter le substrat OPT EIA (BD), 100 µl/puits. Au bout de 20 min, lorsque le

développement de la coloration a lieu, on stoppe la réaction par de l'acide sulfurique 2N et on mesure l'absorbance à 450 nm.

La Figure 6A présente les résultats de ce dosage. Nous avons mis en évidence une diminution de la concentration sérique d'Apo AI chez les sujets ayant un cancer colorectal. La concentration moyenne chez 38 sujets ayant un CCR de stade I à IV est de 675 ± 36 µg/ml alors qu'elle est bien plus élevée chez 27 sujets sains (témoins) : 1040 ± 39 µg/ml. Cette différence est statistiquement très significative ($P < 0,0001$, *t*-test unilatéral). A titre de comparaison, chez 13 sujets ayant un cancer du foie, la concentration sérique moyenne d'Apo AI est de 1175 ± 87 µg/ml avec la technique ELISA sandwich utilisée. La diminution de la concentration sérique met en évidence que Apo AI est donc un marqueur spécifique du cancer colorectal, cette diminution pouvant être mis en évidence par un dosage immunoessai.

La deuxième technique de dosage qui a été utilisée est un dosage multiplex commercialisé par la société Linco qui permet de doser plusieurs Apolipoprotéines dont AI et AII simultanément, dans le même échantillon (Cat. No. APO-62K). Le mode opératoire préconisé par le fabricant a été appliqué.

La Figure 6B présente les résultats de ce dosage. On confirme par cette deuxième technique la diminution de la concentration sérique d'Apo AI chez les patients ayant un CCR. La concentration moyenne d'Apo AI chez 34 sujets ayant un CCR de stade I à IV est de 768 ± 30 µg/ml alors qu'elle est bien plus élevée chez 17 sujets sains (témoins) : 1194 ± 51 µg/ml. Cette différence est statistiquement très significative ($P < 0,0001$, *t*-test unilatéral).

8. Dosage sérique du marqueur tumoral Apolipoprotéine AII

Le dosage de l'Apolipoprotéine AII sérique a été réalisé avec le kit multiplex de Linco. La Figure 7 présente les résultats de ce dosage. Nous avons mis en évidence une diminution de la concentration sérique d'Apo AII chez les sujets ayant un cancer colorectal. La concentration moyenne d'Apo AII chez 34 sujets ayant un CCR de stade I à IV est de 170 ± 11 µg/ml alors qu'elle est bien plus élevée chez 17 sujets sains (témoins) : 277 ± 16 µg/ml. Cette différence est statistiquement très significative ($P < 0,0001$, *t*-test unilatéral).

9. Dosage sérique du marqueur tumoral Plastine-I

La protéine Plastine-I a été dosée à l'aide des anticorps décrits dans l'exemple 2 et d'un test ELISA utilisant l'automate Vidas® (bioMérieux). Pour ce faire, le test ELISA a été construit en utilisant les réactifs du kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. No. 30315). Les réactifs ont été utilisés tels que décrits dans la notice correspondante (réf. 11728 D – FR – 2005/05), avec les modifications suivantes :

1. Les cônes ont été sensibilisés avec l'anticorps de capture 3D11D10 à une concentration de 15 µg/ml.
2. Le contenu du deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra a été remplacé par 300 µl d'anticorps de révélation 8C8C5, couplé à la biotine, dilué à 1 µg/ml dans le tampon du deuxième puits du kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampon avec sérum de chèvre et azoture de sodium à 1 g/l).
3. Les échantillons de sérum, de plasma ou de selle (100 µl) ont été dilués directement dans le deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra.
4. La réaction ELISA a été réalisée à l'aide de l'automate Vidas® et du protocole HBS AG ULTRA.
5. Les résultats ont été obtenus sous forme de valeurs brutes après soustraction du bruit de fond (lecture du substrat avant réaction).

La concentration du marqueur tumoral présente dans le fluide corporel à doser (sang, sérum, plasma, selle) a été calculée selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 2 concernant le dosage du LEI.

Les résultats du dosage de la Plastine-I sérique chez les patients par ELISA sur automate Vidas sont donnés dans le Tableau 6.

Tableau 6

Pathologie ^a	Identifiant échantillon	Nature	Stade	TNM ^b	Plastine-I
					RFV
CCR+	CLSP156/F0	Sérum	IV	TxNxM1	630
CCR+	CLSP068/F0	Sérum	IV	T4N0M1	618
CCR -	N018667/F0	Sérum			295
CCR -	N143574/F0	Sérum			278

a: CCR+ : patients atteints d'un cancer colorectal/ CCR- : sujet sain

b : TNM : stade d'invasion tissulaire (T) , ganglionnaire (lymph nodes, N) et à distance (métastases, M)

Les doses obtenues pour les patients analysés sont reportées sur la Figure 8. Les 2 sérums de patients ayant un cancer colorectal testés montrent une nette augmentation de leur dose de Plastine-I sérique.

10. Dosage sérique des marqueurs tumoraux du groupe B

5 Les marqueurs tumoraux Beta2 Microglobuline, ACE, CA19-9 et Testostérone ont été dosés à l'aide des trousse de dosage de la Demanderesse, respectivement Vidas® Beta2 Microglobulin, Vidas® ACE, Vidas® CA19-9™ et Vidas® Testostérone, en suivant le protocole opératoire propre à chaque trousse.

10 La protéine E-Cadhérine a été dosée à l'aide du kit E-Cadhérine EIA kit (Takara Biochemicals, Tokyo, Japon) en suivant le protocole opératoire du kit.

La protéine Regenerating islet-derived protein 3 alpha, autrement nommée Pancreatitis Associated Protein (PAP1), a été dosée à l'aide du kit ELISA PANCREPAP (DynaBio, Marseille, France) en suivant le protocole opératoire du kit.

15 Les protéines Galectine-3 et LDH ont été dosées à l'aide des anticorps décrits dans l'exemple 2. Le Protéasome 20 S a été dosé à l'aide des anticorps décrits dans le brevet EP0434670. Pour ce faire, les tests ELISA ont été construits en utilisant l'automate Vidas® (bioMérieux) et les réactifs du kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. No. 30315). Les réactifs ont été utilisés tels que décrits dans la notice correspondante (réf. 11728 D – FR – 2005/05), avec les modifications suivantes :

- 20 1. Les cônes ont été sensibilisés avec l'anticorps de capture à une concentration entre 5 et 30 µg/ml.
2. Le contenu du deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra a été remplacé par 300 µl d'anticorps de révélation, couplé à la biotine, dilué à 1 µg/ml dans du tampon avec sérum de chèvre et azoture de sodium à 1 g/l.
- 25 3. Les échantillons de sérum, de plasma ou de selle ont été dilués directement dans le deuxième puits de la cartouche HBs Ag Ultra après, si nécessaire, une dilution en tampon du deuxième puits.
4. La réaction ELISA a été réalisée à l'aide de l'automate Vidas® et du protocole HBS Ag Ultra. L'étape d'incubation de l'échantillon avec les anticorps de
- 30 capture et de révélation a été comprise entre 14 et 100 cycles.
5. Les résultats ont été obtenus sous forme de valeurs brutes après soustraction du

bruit de fond (lecture du substrat avant réaction).

La concentration du marqueur tumoral présente dans le fluide corporel à doser (sang, sérum, plasma, selle) a été calculée selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 2 concernant le dosage du LEI. Les conditions de dosage pour différents marqueurs tumoraux ont été récapitulées dans le Tableau 7.

Tableau 7

Protéine	Galectine-3	LDH-B	Protéasome 20 S
Anticorps de capture	12F8A12 à 15 µg/mL	3F11E11 à 10 µg/mL	GD6 à 30 µg/mL
Anticorps de révélation	14A5G1	12F10G8	7A11
Sérum de chèvre dans le tampon de dilution	Avec	Avec	Sans
Volume de selles	50 µL	50 µL	200µL
Volume de sérum	50 µL	50 µL	100 µL
Dépôt échantillon	2ème puits	2ème puits	1er puits
Durée d'incubation	100 cycles	14 cycles	14 cycles

Les doses obtenues pour les patients analysés avec les marqueurs tumoraux Beta2 Microglobuline, ACE, CA19-9, Testostérone, E-Cadhérine, Regenerating islet-derived protein 3 alpha, Galectine-3, LDH et Protéasome 20S ont été reportées respectivement sur les figures 9 à 17.

Trois sérums de patients ayant un cancer colorectal montrent une augmentation de leur dose de β 2 Microglobuline sérique.

Dix sérums de patients ayant un cancer colorectal montrent une augmentation de leur dose d'ACE sérique. Plus nettement, 1 sérum de patient ayant un cancer colorectal de stade III et 7 sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade IV montrent une élévation importante de leur dose d'ACE sérique.

Neuf sérums de patients ayant un cancer colorectal montrent une augmentation de leur dose de CA 19-9 sérique. Plus nettement, 1 sérum de patient ayant un cancer colorectal de stade III et 7 sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade IV montrent une élévation importante de leur dose de CA 19-9 sérique.

Dix sérums de patients ayant un cancer colorectal montrent une diminution de leur dose de Testostérone sérique. Plus nettement, 1 sérum de patient ayant un cancer colorectal de stade II, 1 sérum de patient ayant un cancer colorectal de stade III et 2

sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade IV montrent un effondrement de leur dose de Testostérone sérique.

Deux sérums de patients ayant un cancer colorectal montrent une augmentation de leur dose de Regenerating islet-derived protein 3 alpha sérique.

5 Quatre sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade IV, 2 sérums de patients ayant un cancer colorectal de stade III et 1 sérum de patient ayant un cancer colorectal de stade II montrent une nette augmentation de leur dose de Galectine-3 sérique.

10 Exemple 4 : Dosage des marqueurs tumoraux dans les selles

L'extraction des selles est réalisée à partir d'un morceau pesant approximativement 1g, auquel on ajoute 10 ml de tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2 contenant 1 g/L d'azide. On homogénéise sur un Vortex pendant 1 min. L'échantillon subit ensuite 4 cycles d'ultrasons de 7s sur la glace. La fraction non
15 solubilisée est éliminée par centrifugation à 2000 g, pendant 10 min, à 4°C. Le surnageant est conservé à -30°C jusqu'au dosage.

Les dosages ELISA décrits dans l'exemple 3 ont été utilisés pour rechercher les marqueurs tumoraux dans les selles après, si nécessaire, une dilution adaptée des selles dans le tampon du premier puits de la cartouche HBs Ag Ultra.

20 Les dosages obtenus avec les tests, Aminoacylase 1, Galectine-3 et Protéasome 20S ont été représentés respectivement sur les Figures 18 à 20. Une augmentation de la dose d'Aminoacylase 1, de Galectine-3 et de Protéasome 20S est observée respectivement pour 10, 14 et 8 selles de patients atteints d'un cancer colorectal.

25 Exemple 5 : Détection par la technique ELISPOT des marqueurs tumoraux
 1. Culture cellulaire

La lignée de cancer de la prostate LnCAP est cultivée dans le milieu RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM L-Glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate et 10% SVF(tous Gibco). Ces cellules sont utilisées comme témoin négatif.

30 La lignée de cancer colorectal Caco-2 est cultivée dans le milieu DMEM contenant 2 mM de L-Glutamine, sans SVF (tous Gibco).

La lignée de cancer colorectal HT-29 est cultivée dans le milieu MEM contenant 2 mM de L-Glutamine et 10% SVF (tous Gibco).

La lignée de cancer colorectal HT-29/B6 est cultivée dans le milieu DMEM contenant 4 mM de L-Glutamine, sans SVF (tous Gibco).

5 Les cellules sont maintenues à 37°C, dans une étuve avec 5% de CO₂.

2. La technique ELISPOT

Ce mode opératoire permet de déterminer le nombre de cellules sécrétant la protéine. Les plaques d'ELISPOT 96 puits avec des membranes de PVDF (Multiscreen IP, Millipore) sont coatées par l'anticorps monoclonal de souris anti-marqueur tumoral
10 à 10µg/ml (anticorps de capture, voir le Tableau 8 ci-dessous qui donne les anticorps utilisés en ELISPOT), 100 µl par puits, dans du PBS stérile, sur la nuit à +4°C. Les plaques sont ensuite lavées au PBS et saturées avec du milieu de culture contenant 10% SVF. Parallèlement, les cellules sont trypsinées, comptées, puis diluées à 10⁵ cellules/ml. On distribue 200 µl de cette suspension cellulaire par puits, ainsi que des
15 dilutions en cascade de cette solution mère. Les plaques sont alors incubées 20 h à 37°C en atmosphère humide à 5 % CO₂, puis lavées au PBS contenant 0,05% de Tween-20. Les cellules restantes sont alors lysées par un traitement à l'eau glacée pendant 10 minutes, puis les plaques sont lavées encore. On ajoute ensuite l'anticorps de révélation, le monoclonal biotinylé dirigé contre le marqueur tumoral à doser
20 (Tableau 8), à 0,1µg/puits (incubation 2h à température ambiante). Les spots sont révélés par l'ajout d'extravidine-phosphatase alcaline (Sigma) et du substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, Biorad). Le bruit de fond correspond au nombre de spots mesuré dans les puits LnCap et varie entre 0 et 8 spots dans les conditions de lecture utilisées. Le nombre moyen de spots non
25 spécifiques a été soustrait du signal spécifique.

Tableau 8

Marqueur	Ac capture	Ac détection
LEI	10E1H1	21B10A5
Ezrine	4A9H5	4A7A6C1
Galectine-3	12F8A12	14A5G1

3. Résultats

Le nombre de cellules Caco-2, HT-29 et HT-29 B6 sécrétant le marqueur

tumoral d'intérêt par 1 million de cellules incubées est présenté dans la Figure 21. La technique ELISPOT permet de confirmer le relarguage ou la sécrétion des marqueurs tumoraux par les lignées de cancer de côlon. Il sera possible d'effectuer une recherche de cellules tumorales circulantes chez les patients en utilisant cette technique, selon le
5 procédé de la demande de brevet WO03/076942 déposé par la Demanderesse.

Exemple 6 : Détection des marqueurs tumoraux à partir de tissus coliques par immunohistochimie

1. Méthodologie

10 Dans un premier temps, les lames de tissue-micro-array sont déparaffinées. Pour cela, elles sont incubées successivement dans les bains suivants pendant 10 minutes : methycyclohexane (2 fois), éthanol 100%, éthanol 95%, éthanol 70% et eau. Les lames sont ensuite rincées au TBS 0,1% Tween 20 (TBS-T), pendant 10 min, sous agitation. Les antigènes sont réactivés dans le tampon citrate 10 mM pH6, en chauffant jusqu'à
15 90°C pendant 40 min, puis en laissant refroidir à température ambiante pendant 30 min. Les peroxydases endogènes sont inhibées par incubation dans du TBS-T contenant 3% de H₂O₂, pendant 5 min. Les lames sont ensuite saturées par 3% de BSA en TBS-T, pendant 1h à 37°C, en chambre humide.

Puis, les lames sont incubées pendant 2h avec l'anticorps primaire anti-
20 Leucocyte Elastase Inhibitor (clone 3D9C2), anti-Ezrine (clone 5G2D12), anti-Aminoacylase 1 (clone 8A8A10) ou anti Plastine-I (clone 8D6A3) dilué à 10µg/ml dans du TBS-T contenant 3% de BSA (incubation à 37°C en chambre humide). Après 3 lavages de 10 min au TBS-T, les lames sont incubées 2h à 37°C en chambre humide avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase de raifort (Cat. No. 115-
25 035-003 Jackson Immunoresearch) dilué au 1/400 dans la solution de saturation. Les lames sont lavées 3 fois 10 minutes dans du TBS-T, puis encore 3 fois 10 min dans du PBS. La révélation est réalisée avec le substrat Sigma Fast (Cat. No. D-4168, Sigma-Aldrich) pendant 5 min. La coloration est arrêtée par lavage dans le PBS. On effectue
30 pendant 30 sec. Après lavages à l'eau et au PBS, les lames sont montées pour observation au microscope.

Les anticorps utilisés pour le marquage par immunohistochimie ont été sélectionnés spécifiquement pour cette application, indépendamment de leur réactivité en ELISA ou en Western blot.

2. Détection du Leucocyte Elastase Inhibitor par immunohistochimie

Des lames de tissu-micro-array ont été utilisées pour cribler un grand nombre de prélèvements. Il s'agit de tissus coliques spottés sur lames. Les caractéristiques des patients (caractéristiques des spots de tissu colique présents sur le tissu-micro-array cancer colorectal), ainsi que les résultats des immunomarquages par l'anticorps anti-Leucocyte Elastase Inhibitor sont récapitulés dans le Tableau 9.

Tableau 9

Diagnostic	Histologie caractérisation génétique	et Marquage dans les cellules épithéliales	Marquage dans le stroma
Tumeur maligne	Adénocarcinome conservé	Positif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome conservé	Positif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
Tumeur bénigne	Adénome	Négatif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome conservé	Positif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome LOH	Positif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome LOH	Positif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome LOH	Négatif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome LOH	Positif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome MSI High	Positif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome MSI High	Positif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome Colloïde	Négatif	Négatif
Tumeur maligne	Adénocarcinome Colloïde	Négatif	Négatif
Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif

Normal	Muqueuse normale	Négatif	Négatif
--------	------------------	---------	---------

Les résultats dans le tableau mettent en évidence que, dans les biopsies de muqueuses coliques saines, il n'y a pas de marquage (10 négatifs). Le marquage est également négatif dans l'adénome (1/1). Le marquage est positif dans les cellules épithéliales des adénocarcinomes coliques (+ chez 8/11 patients). Il n'y a aucun marquage dans le stroma.

3. Détection de l'Ezrine par immunohistochimie

Des lames de tissue-micro-array ont été utilisées pour cribler un grand nombre de prélèvements. Il s'agit de tissus coliques spottés sur lames. Pour chaque patient avec un adénocarcinome colique, 3 prélèvements au centre de la tumeur, 3 prélèvements au niveau du front d'invasion et 3 prélèvements dans le tissu sain ont été effectués. Le Tableau 10 présente les résultats des immunomarquages par l'anticorps anti-Ezrine, le niveau de marquage indiqué est le maximum d'intensité sur les 3 prélèvements analysés.

Tableau 10

Identifiant patient	Centre de la tumeur	Front invasion tumoral	Tissu sain
55	+	++	0
127	+	+	0
329	+	++	+
475	+	++	+
544	+	++	+
726	+	+	+
1203	++	++	+
1310	++	+++	+
2003	+	0	+
2296	++	++	0
2301	+	++	+
2377	+	+	0
3095	+	+	0
3430	+	+	0
3636	+	+	0
3748	+	+	0
3839	+	++	0
3891	0	0	0
4054	+	+	0
4322	+	++	0
445	0	++	+
4474	++	++	0
4792	+	+	+
4958	++	++	+
5101	+	++	+

57

5318	++	+++	0
5374	+	+	0
5472	+	0	+
6340	++	+	0
6353	++	+	0

Dans un échantillonnage de 30 patients, 25 ont une surexpression de l'Ezrine au niveau tumoral (centre de la tumeur ou front d'invasion) par rapport au tissu sain adjacent.

5 4. Détection de l'Aminoacylase 1 par immunohistochimie

Des lames de tissue-micro-array ont été utilisées pour cribler un grand nombre de prélèvements. Il s'agit de tissus coliques spottés sur lames. Pour chaque patient avec un adénocarcinome colique, 3 prélèvements au centre de la tumeur, 3 prélèvements au niveau du front d'invasion et 3 prélèvements dans le tissu sain ont été effectués. Le Tableau 11 présente les résultats des immunomarquages par l'anticorps anti-Aminoacylase, le niveau de marquage indiqué est le maximum d'intensité sur les 3 prélèvements analysés.

Tableau 11

Identifiant patient	Centre de la tumeur	Front invasion tumoral	Tissu sain
55	++	++	0
127	0	0	0
329	++	++	0
475	++	++	+
544	+	0	0
726	0	0	0
1203	0	+	0
1310	0	+	+
2003	++	0	0
2296	+	+	0
2301	+	+	+
2377	+	+	+
3095	+	+	0
3430	+	+	+
3636	++	+	+
3748	++	++	0
3839	++	++	+
3891	++	++	0
4054	+	++	0
4322	+++	+++	+
445	+	++	+
4474	+	++	+
4792	++	++	+
4958	+	+	+
5101	+	+	++

58

5318	+++	++	0
5374	+	+	0
5472	++	++	+
6340	++	++	+
6353	++	++	++

Dans un échantillonnage de 30 patients, 21 ont une surexpression de l'Aminoacylase au niveau tumoral (centre de la tumeur ou front d'invasion) par rapport au tissu sain adjacent.

5. Détection de la Plastine-I par immunohistochimie

Des lames de tissu-micro-array ont été utilisées pour cribler un grand nombre de prélèvements. Il s'agit de tissus coliques et rectaux spottés sur lames. Les caractéristiques des patients (caractéristiques des spots de tissu colique présents sur le tissu-micro-array cancer colorectal), ainsi que les résultats des immunomarquages par l'anticorps anti-Plastine-I sont récapitulés dans le Tableau 12.

Tableau 12

Diagnostic		Histologie et les cellules épithéliales	Marquage dans le stroma
Tumeur	maligne		
côlon		Adénocarcinome conservé	++
Tumeur	maligne		
côlon		Adénocarcinome conservé	++
Normal côlon		Muqueuse normale	+
Normal côlon		Muqueuse normale	+
Normal côlon		Muqueuse normale	+
Tumeur	bénigne		
côlon		Adénome	+
Tumeur	maligne		
côlon		Adénocarcinome conservé	+
Tumeur	maligne		
côlon		Adénocarcinome LOH	++
Tumeur	maligne		
côlon		Adénocarcinome LOH	++
Normal côlon		Muqueuse normale	+
Normal côlon		Muqueuse normale	+
Normal côlon		Muqueuse normale	+
Tumeur	maligne		
côlon		Adénocarcinome LOH	++
Tumeur	maligne		
côlon		Adénocarcinome LOH	++
Tumeur	maligne	Adénocarcinome MSI High	+

côlon				
Normal côlon	Muqueuse normale	+		Décollé
Normal côlon	Muqueuse normale	+		Décollé
Tumeur maligne				
côlon	Adénocarcinome Colloïde	+		Négatif
Normal côlon	Muqueuse normale	++		Négatif
Normal côlon	Muqueuse normale	++		Négatif
Normal rectum	Muqueuse normale rectum	++		Négatif
Normal rectum	Muqueuse normale rectum	Non spécifique		Négatif
Normal rectum	Muqueuse normale rectum	Non spécifique		Négatif
Normal rectum	Muqueuse normale rectum	Non spécifique		Négatif
Tumeur maligne				Négatif
rectum	Adénocarcinome LOH	+		
Tumeur maligne				Négatif
rectum	Adénocarcinome LOH	++		
Tumeur maligne				Négatif
rectum	Adénocarcinome LOH	++		
Tumeur maligne				Négatif
rectum	Adénocarcinome LOH	++		
Tumeur bénigne	Adénome dysplasie de bas			Négatif
rectum	grade	++		
Tumeur bénigne	Adénome dysplasie de bas			Négatif
rectum	grade	++		
Tumeur bénigne	Adénome dysplasie de bas			Négatif
rectum	grade	+		
Tumeur bénigne	Adénome dysplasie de bas			Négatif
rectum	grade	+		
Tumeur bénigne	Adénome dysplasie de bas			Négatif
rectum	grade	+		
Tumeur bénigne	Adénome dysplasie de bas			Négatif
rectum	grade	++		
Tumeur bénigne	Adénome dysplasie de bas			Négatif
rectum	grade	++		
Tumeur bénigne	Adénome dysplasie de bas			Négatif
rectum	grade	++		

Les résultats dans le tableau mettent en évidence que :

- dans les biopsies de muqueuses coliques saines, le marquage est faible dans 8 prélèvements (+) et 2 prélèvements sont à ++. Le marquage est également faible à + dans l'adénome colique (1/1). Le marquage est positif fort ++ dans les cellules épithéliales des adénocarcinomes coliques (++ chez 6/9 patients et 3 faibles + dont les

adénocarcinomes colloïdes coliques). Il n'y a aucun marquage dans le stroma.

- dans les biopsies de muqueuses rectales saines, le marquage est présent au niveau de l'épithélium de surface de manière non spécifique (3/4) et à ++ dans un prélèvement. Le marquage est positif fort à ++ dans les adénomes rectaux (5/9) ou discret à + (4/9). Le marquage est également fort ++ dans les cellules épithéliales des adénocarcinomes rectaux (++) chez 3/4 patients, 1 faible +). Il n'y a aucun marquage dans le stroma.

Exemple 8 : Détection des marqueurs tumoraux par la technique LC-MRM-MS

10 1. Méthodologie

Afin de pouvoir baisser la limite de détection à quelques ng/ml, un procédé amélioré de MRM-MS a été mis en œuvre. Les étapes successives de ce procédé sont :

1) immunodéplétion des protéines abondantes, 2) digestion trypsique, 3) fractionnement SPE (solid-phase extraction) des peptides, 4) chromatographie liquide
15 (LC) couplée à la MRM-MS.

La mise au point a été réalisée sur des échantillons surchargés (spike) en ajoutant les protéines recombinantes ACY, Ezrine, L-FABP, PDI ou Plastine I dans un pool de sérum contrôle, à une concentration de 10-250 ng/ml. Les Apolipoprotéines A1 et A2 sont naturellement présentes dans le sérum.

20 *Immunodéplétion.* La déplétion des protéines abondantes du sérum a été réalisée en utilisant le kit commercial Vivapure anti-HSA de Vivascience. Alternativement, le kit Proteoextract Albumin/IgG de Calbiochem et le AurumTM serum Protein Minikit de Bio-Rad ont aussi été utilisés. Il est aussi possible de produire les résines spécifiques au laboratoire, en couplant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine à dépler sur
25 une résine Sepharose 4B activée au CNBr (Amersham Bioscience), en suivant les instructions du fabricant.

Digestion enzymatique. Les échantillons de sérums déplétés sont dénaturés dans une solution d'urée 6M tamponnée par 10 mM de Tris pH 8 et contenant 30 mM de dithiothreitol, pendant 40 minutes à 40°C, puis alkylés par de l'iodoacétamide 50 mM,
30 à température ambiante, pendant 40 minutes, à l'obscurité. Ils sont dilués 6 fois dans l'eau, puis la digestion trypsique est réalisée à 37°C, sur la nuit, en utilisant un ratio

enzyme substrat de 1:30 (Promega). La digestion est arrêtée par ajout d'acide formique à une concentration finale de 0,5%. Les échantillons digérés sont dessalés par extraction sur phase solide (SPE, solid phase extraction) en utilisant les cartouches en phase inverse Oasis HLB 3cc (60 mg) (Waters). Après application de l'échantillon, les
5 cartouches sont lavées par 1 ml d'acide formique à 0,1%, puis l'élution a été réalisée par un mélange méthanol/eau (80/20 v/v) contenant 0,1% d'acide formique. Les éluats sont séchés sous vide.

Fractionnement SPE. Les échantillons secs sont repris dans 1 ml de tampon acétate et chargés sur les cartouches mixtes (hydrophobe et échange de cation) Oasis
10 MCX (mixed cation exchange) 60 mg (Waters) équilibrées au préalable en tampon acétate et méthanol. Les cartouches sont lavées par 1 ml de tampon acétate et 1 ml de méthanol. Les peptides d'intérêt (Tableau 13) sont élués par 1 ml d'un mélange méthanol/tampon acétate (50/50 v/v)). Le pH du tampon acétate est choisi en fonction du point isoélectrique du peptide d'intérêt. Les éluats sont séchés sous vide, dissous
15 dans 200 µl d'une solution d'acétonitrile/eau (3/97 v/v) contenant 0,1% d'acide formique. Un aliquot de 50 µl a été injecté dans la LC couplée à un système MS-MS.

Chromatographie liquide et spectrométrie de masse. L'analyse LC-MS a été effectuée sur un système chromatographique haute pression (HPLC) de type HP 1100 series avec pompe binaire et injecteur (Agilent Technologies) couplé à un spectromètre
20 de masse, soit un Sciex API 2000 triple quadripôle, soit un Sciex API 4000 Qtrap (MS hybride triple quadripôle – trappe ionique) (MDS Sciex) pour une meilleure sensibilité. La séparation LC a été effectuée sur une colonne C₁₈ Symmetry (Waters), à un débit d'élution de 300 µl/min. (Eluent A = 0,1% acide formique dans l'eau, éluent B = 0,1% acide formique dans l'acétonitrile, gradient linéaire de 5%B à 50%B en 25 min, puis de
25 50%B à 100%B en 3 min). L'analyse MS est réalisée en mode d'ionisation positive à une tension de 5500 V appliquée à l'aiguille permettant l'ionisation dans la source. Le contrôle de l'instrument et l'acquisition des données sont réalisés avec le logiciel Analyst 1.4.1. Les débits du gaz de nébulisation (air) et du gaz rideau (azote) sont de 30 et 20 psi, respectivement. La source ionique Turbo VTM est réglée à 400°C, le flux
30 d'azote auxiliaire à 40 psi. Les transitions MRM enregistrées pour chaque peptide sont récapitulées dans le Tableau 13. L'énergie de collision (CE), la tension d'orifice

(DP, declustering potential) et la tension à la sortie de la cellule de collision (CXP, collision cell exit potential) sont optimisées pour chacune des transitions MRM sélectionnées.

2. Résultats

5 Pour chaque marqueur tumoral (protéines du Tableau 13), la liste des transitions MRM théoriques a été générée en utilisant le logiciel MIDAS (MRM-initiated Detection and Sequencing). Cette liste comprend tous les ions parents di- ou tri- chargés des peptides tryptiques théoriques dans un intervalle de masse allant de 800 à 3000 Da et tous les ions fragments possibles de type y ou b. Pour chaque protéine, 10 chaque transition possible a été testée afin de déterminer les transitions les plus sensibles et les plus spécifiques. Le résultat de cette sélection est récapitulé dans le Tableau 13. En utilisant un peptide lourd de type AQUA (Sigma) ou encore une protéine recombinante lourde qui serviront d'étalon de dosage, il est possible de quantifier de manière absolue le marqueur tumoral d'intérêt dans un milieu biologique 15 complexe.

Tableau 13

<i>Apolipoprotéine A1</i>						
Séquence (SEQ ID N°)	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
AKPALEDLR (SEQ ID N°16)	6,38	338,2	288,2	14	20	5
			403,2	14	15	10
			532,3	14	15	25
ATEHLSTLSEK (SEQ ID N°17)	5,53	405,9	173,1	20	20	10
			363,2	20	25	20
LSPLGEEMR (SEQ ID N°18)	4,54	516,3	201,1	20	20	5
			831,4	20	20	40
			621,3	30	30	15
QGLLPVLESFK (SEQ ID N°19)	6,11	615,9	299,2	20	30	15
			819,5	20	35	40
			186,1	20	35	5
THLAPYSDELRL (SEQ ID N°20)	5,39	651,3	239,1	20	30	5
			352,2	20	35	15
			879,4	20	35	25
VQPYLDDDFQK (SEQ ID N°21)	3,71	626,8	228,1	15	25	5
			1025,5	15	20	30
			513,2	15	25	25
DYVSQFEGSALGK	4,13	700,8	279,1	15	35	5

(SEQ ID N°22)			378,2	15	20	10
			1023,5	15	20	25
			204,1	15	25	5
Apolipoprotéine A2						
EQLTPLIK (SEQ ID N°23)	6,4	471,3	260,2	20	30	15
			147,1	20	30	25
			684,5	20	20	35
Aminoacylase						
Séquence	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
AVGVPALGFSPMNR (SEQ ID N°24)	10,35	708,4	517,3	20	30	23
			808,4	20	35	28
			228,1	20	32	7
			1089,6	20	32	32
VVNSILAFR (SEQ ID N°25)	10,35	509,8	199,1	15	25	5
			820,5	15	25	28
			506,3	15	25	20
			393,2	15	25	15
EGSVTSVNLTK (SEQ ID N°26)	6,99	567,8	248,2	15	28	7
			661,4	15	28	25
			762,4	15	28	32
GPEEEHPSVTLFR (SEQ ID N°27)	4,58	749,3	819,5	20	38	35
			956,5	20	38	30
Ezrine						
Séquence	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
IGFPWSEIR (SEQ ID N°28)	7,04	552,8	787,2	20	27	25
			288	20	27	10
			690,1	20	27	22
			504,1	20	27	20
ELSEQIQR (SEQ ID N°29)	4,31	501,8	303,0	20	25	15
			416,2	20	25	18
			760,2	20	25	25
SGYLSSER (SEQ ID N°30)	10,1	449,7	478,2	20	25	20
			591,4	20	22	20
			391,0	20	22	15
APDFVIFYAPR (SEQ ID N°31)	6,76	591,8	272,2	20	28	10
			1111,6	20	28	35
L-FABP						
Séquence	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
AIGLPEELIQK (SEQ ID N°32)	4,54	605,8	856,5	32	29	22
			1026,58	32	30	27
			185,1	32	30	5
			242,2	32	33	5
GVSEIVQNGK (SEQ ID N°33)	6,36	515,8	658,4	28	30	35
			545,3	28	30	30

			157,1	28	30	10
			446,2	28	30	25
TVVQLEGDNK (SEQ ID N°34)	4,13	551,8	261,2	35	28	10
			675,33	35	28	34
			201,1	35	28	10
FTITAGSK (SEQ ID N°35)	9,0	412,7	576,3	23	27	30
			463,3	23	27	30
			249,1	23	27	10
PDI						
Séquence	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
EADDIVNWLK (SEQ ID N°36)	3,74	601,8	560,3	20	27	18
			659,4	20	27	22
DHENIVIAK (SEQ ID N°37)	5,24	519,8	253,1	20	25	10
			331,2	20	25	13
			786,4	20	25	30
			657,4	20	25	25
LITLEEEMTK (SEQ ID N°38)	4,01	603,8	328,2	20	30	11
			766,3	20	30	25
			980,5	20	30	32
ENLLDFIK (SEQ ID N°39)	4,11	496,3	407,3	20	25	16
			522,3	20	25	21
			635,4	20	25	26
Plastine I						
Séquence	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
QFTPADVVSGNPK (SEQ ID N°40)	6,96	729,8	983,4	20	27	30
			1183,6	20	27	35
SLADGILLCK (SEQ ID N°41)	6,08	545,3	889,4	20	25	28
			533,4	20	25	20
			703,4	20	25	25
			818,4	20	25	28

Références bibliographiques

- 1 : J.D. Potter, 1999, J Natl Cancer Inst, 91, 916-32
- 2 : J. Faivre, 2001, Epidémiologie et dépistage du cancer colorectal, Ed. Springer
- 5 3 : C.S. Lin, et al., 1993, J Biol Chem, 268, 2781-92
- 4 : V. Delanote et al., 2005, Acta Pharama Sinica, 769-779
- 5 : E. Remold-O'Donnell et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA, 89, 563-5639
- 6 : J. Cooley et al., 2001, Biochemistry, 15762-15770
- 7 : M. Algrain et al., 1993, J Cell Biol, 120, 129-139
- 10 8 : W.G. Jiang et S. Hiscox, 1996, Anticancer Res, 16, 861-865
- 9 : S. Hiscox et W.G. Jiang, 1999, J Cell Sci, 112, 3081-3090
- 10 : T. Xiao et al, 2005, Mol Cell Proteomics, 4, 1480-1486
- 11 : M. Anders et W. Dekant, 1994, Advances in Pharmacology, 431-448
- 12 : K. Lorentz et al., 1975, Clinica Chimica Acta, 263-269
- 15 13 : K. Lorentz et B. Flatter, 1975, Clinica Chimica Acta, 271-274
- 14 : R.M. Cook et al., 1993, J Bio Chem, 17010-17017
- 15 : Y.E. Miller et al., 1989, J Clin Invest, 2120-2124
- 16 : S. Balabanov et al., 2001, Eur J Biochem, 5977-5980
- 17 : E. Chan et al., 1985, J Biol Chem, 260, 2629-2632
- 20 18 : R. Das et al., 2001, Clin Cancer Res, 7, 1706-1715
- 19 : J. Stulik et al., 2001, Electrophoresis, 22, 3019-3025
- 20 : T. Yamazaki et al., 1999, J Surg Oncol, 72, 83-87
- 21 : D.A. Sweetser et al., 1987, J Biol Chem, 266, 16060-16071
- 22 : M. Pelsers et al., 2003, Clin Biochem, 36, 529-535
- 25 23 : R. Xiao, et al., 2005, Molecular Cancer, 4, 1-17
- 24 : E.E. Niederkofler et al., 2003, J Lipid Res, 44, 630-639
- 25 : G.L. Hortin, 2006, Clinical Chemistry, 52(7), 1223-1237
- 26 : J.Y. Engwegen et al., 2006, World J Gastroenterol, 12(10), 1536-1544
- 27 : Z. Zhang et al., 2004, Cancer Research, 64, 5882-5890
- 30 28 : H. Hachem et al., 1986, J Chem Clin Biochem, 24, 161-166
- 29 : A.P. Arrigo et al., 1988, Nature, 331, 192-194

- 30 : T Lavabre-Bertrand et al., 2001, Cancer, 92, 2493-2500
- 31 : S. Nakahara et al., 2005, Apoptosis, 10, 267-275
- 32 : I. Iurisci et al., 2000, Clin Can Res, 6, 1389-1393
- 33 : M.K. Schwartz, 2006, Clin Chim Acta, 1992, 77-82
- 5 34 : D.J. McCool et al., 1999, Biochem J., 593-600
- 35 : J.L. Iovanna et al., 1994, Gastroenterology, 106, 728-734
- 36 : Y. Motoo et al., 1999, Dig Dis Sci, 44, 1142-1147
- 37 : M. Herlyn et al., 1979, Proc Natl Acad Sci USA, 76, 1438-1442
- 38 : A. Armstrong et S. Eck, 2003, Cancer Biol Ther, 2, 320-325
- 10 39 : D. Herlyn et al., 1982, Proc Natl Acad Sci USA, 79, 4761-4765
- 40 : H Abe et al., 2002, J Immunol Methods, 270, 227-233
- 41 : V. Barak et al., 2004, Clin Biochem, 37, 529-540
- 42 : H. Kim et al., 2006, Ann Clin Lab Sci, 36, 294-298
- 43 : F. Roca et al., 2006, J Surg Oncol, 151-160
- 15 44 : C.H. Damsky et al., 1983, Cell, 455-466
- 45 : M. Katayama et al., 1994, Br J Cancer, 580-585
- 46 : C. Willmanns et al., 2004, Clin Exp Metastasis, 75-78
- 47 : P. Gold et S. Freedman, 1965, J Exp Med, 467-481
- 48 : M. Duffy, 2001, Clin Chem 624-630
- 20 49 : Y. Kim et al., 2003, Ann Clin Lab Sci, 32-38
- 50 : J.L. Magnani et al., 1983, Cancer Research, 43, 5489-5492
- 51 : J. Holmgren et al., 1984, Br Med J (Clin. Re. Ed.), 288, 1479-1482
- 52 : T.L. Klug et al., 1986, Int J Cancer, 38, 6661-669
- 53 : P. Kuusela et al., 1991, Br J Cancer, 63, 636-640
- 25 54 : M. Holland et al., 1993, Medicina (B. Aires), 53(2), 117-23
- 55 : F. Model et al., juillet 2006, World Congress on Gastrointestinal Cancer,
« Detection of Methylated DNA in Plasma from Colorectal Cancer Patients and
Controls by Real-Time PCR Analysis of Septin 9 »
- 56 : M.P. Ebert et al., 2006, Gastroentrology, 131(5), 1418-1430
- 30 57 : C. Bianco et al., 2006, Clin Cancer Res, 12, 5158-5164
- 58 : R. Yasumatsu et al., 2006, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291, L619-L627

- 59 : J. Chevalier et al., 1997, J Histochem Cytochem, 45, 481-491
- 60 : S. Patterson, 2000, Physiological Genomics 2, 59-65
- 61 : L. Anderson et C.L. Hunter, 2006, Mol Cell Proteomics, 5, 573-588.
- 62 : L.J. Kricka et al., 1999, Clinical Chemistry, 45(4), 453-458
- 5 63 : S. Tyagi et F.R. Kramer, 1996, Nature Biotech, 14, 303-308
- 64 : T. F. Imperiale et al., 2004, N Engl J Med, 351(26), 2704-2714
- 65 : D.A. Ahlquist et al., 2000, Gastroenterology, 119, 1219-1227
- 66 : I. H. Wong, 2006, Methods Mol Biol, 336, 33-46
- 67 : M. P. Ebert et al., 2005, Neoplasia, 7(8), 771-778
- 10 68 : C. Lofton-Day et al., 2007, AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles, U.S.A.,
Poster no LB-165, Clinical case-control study in plasma shows that the DNA
methylation biomarker, Septin-9, detects 70% of stage I-III colorectal cancer patients
- 69 : P. Métézeau et al., La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou
pathologique (Tome I), Eds Medsi-MacGrawhill
- 15 70 : Mathieu J. et al. 2006. Fonctions cellulaires et métabolisme. In: (coordonnateurs :
Ronot X. et al.). La cytométrie en flux. Tec & Doc, 255-298. ISBN 978-2-7430-0898-7
- 71 : V. Cheynet et al., 1993, Protein Expr Purif, 4(5), 367-372
- 72 : G. Köhler et C. Milstein, 1975, Nature, 256, 495-497
- 73 : G. Köhler et C. Milstein, 1976, Eur J Immunol, 6, 511-519

REVENDICATIONS

1. Procédé de diagnostic *in vitro* du cancer colorectal par détermination de la
5 présence du marqueur Plastine-I dans un échantillon biologique issu d'un patient
suspecté d'être atteint du cancer colorectal.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon
biologique est un échantillon distant de la tumeur.

10

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste
également à déterminer la présence d'au moins un autre marqueur tumoral choisi parmi
les marqueurs suivants : Leucocyte Elastase Inhibitor, Ezrine, Aminoacylase 1, Liver
Fatty Acid-Binding Protein, Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, Apolipoprotéine AI
15 et Apolipoprotéine AII.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce
qu'il consiste également à déterminer la présence d'au moins un autre marqueur
tumoral choisi parmi les marqueurs suivants : Beta 2 Microglobuline, Protéasome 20S,
20 Galectine-3, L-Lactate Deshydrogénase Chaîne B, Calréticuline, Regenerating Islet-
Derived Protein 3 Alpha, Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1, Keratine
type II Cytoskeletal 8, Keratine type I Cytoskeletal 18, Keratine type I Cytoskeletal 19,
Epithelial-Cadhérine, ACE, Villine, CA19-9, CA 242, CA 50, CA 72-2, Testostérone,
TIMP-1, Cripto-1, Intélectine-1, Protéine Disulfide Isomérase, Cytokératine 20,
25 Translationally-Controlled Tumor Protein, (Pro)défensine-A5, la détection d'ADN
méthylé dans le sang, de préférence l'ADN méthylé du gène AXL4 ou l'ADN méthylé
du gène Septin-9, la détection d'altérations spécifiques de fragments d'ADN dans les
selles comme des mutations spécifiques de l'ADN dans les selles ou des altérations
spécifiques du profil de méthylation de l'ADN dans les selles, la détection
30 d'hémoglobuline humaine dans les selles.

5. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique, le pronostic et le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer colorectal.

5 6. Anticorps monoclonaux anti-Plastine-I.

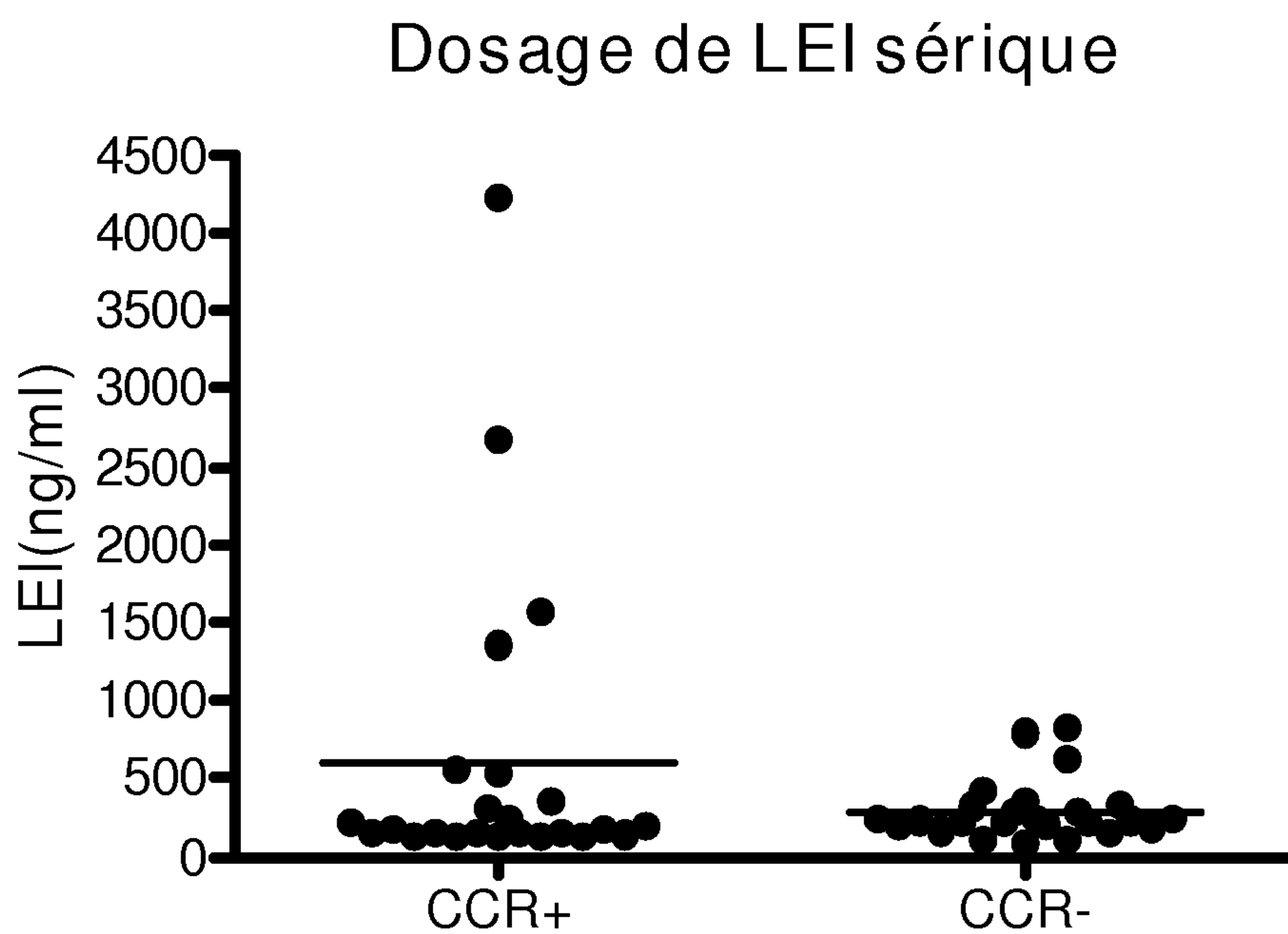


Figure 1

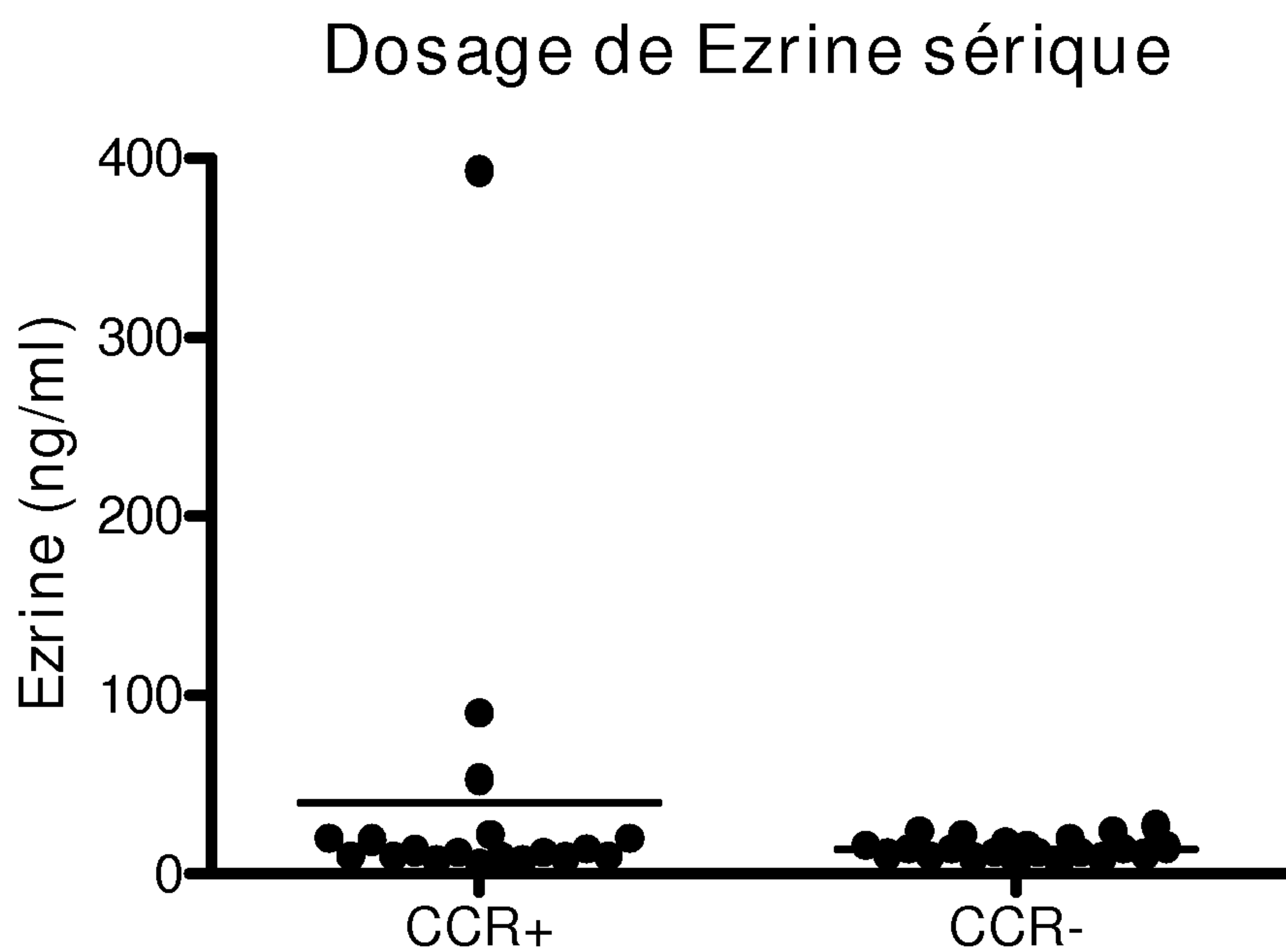


Figure 2

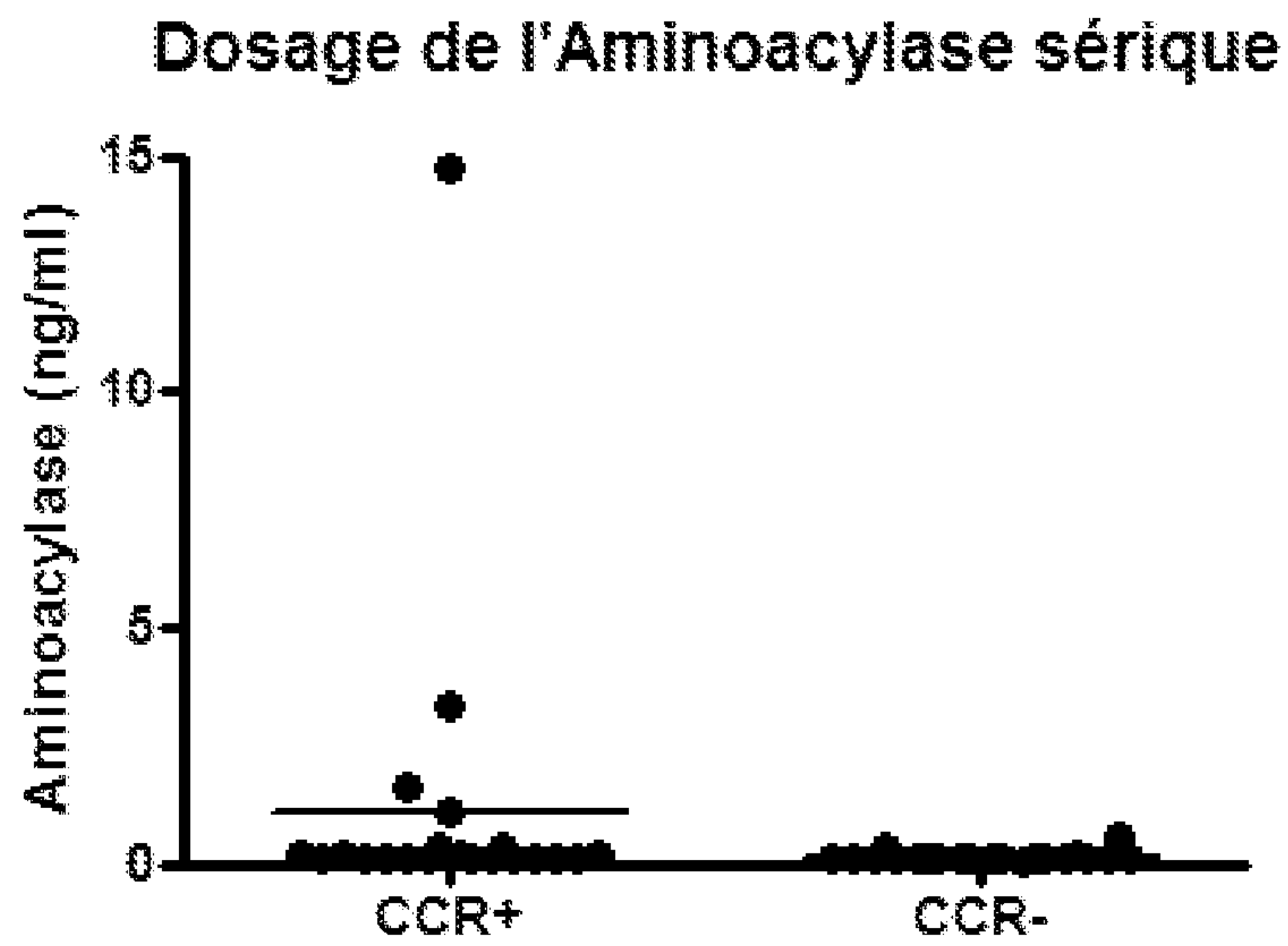


Figure 3

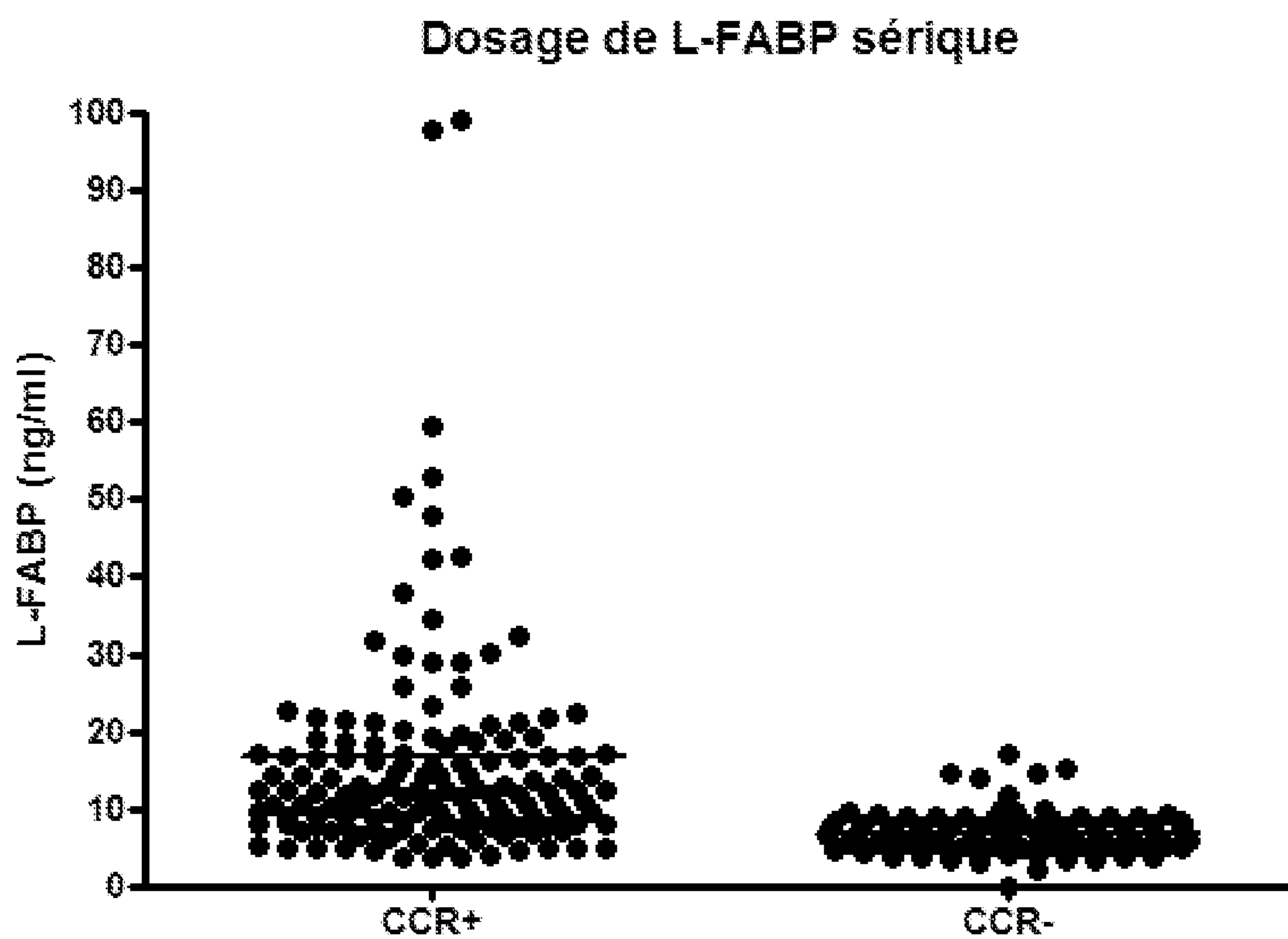


Figure 4

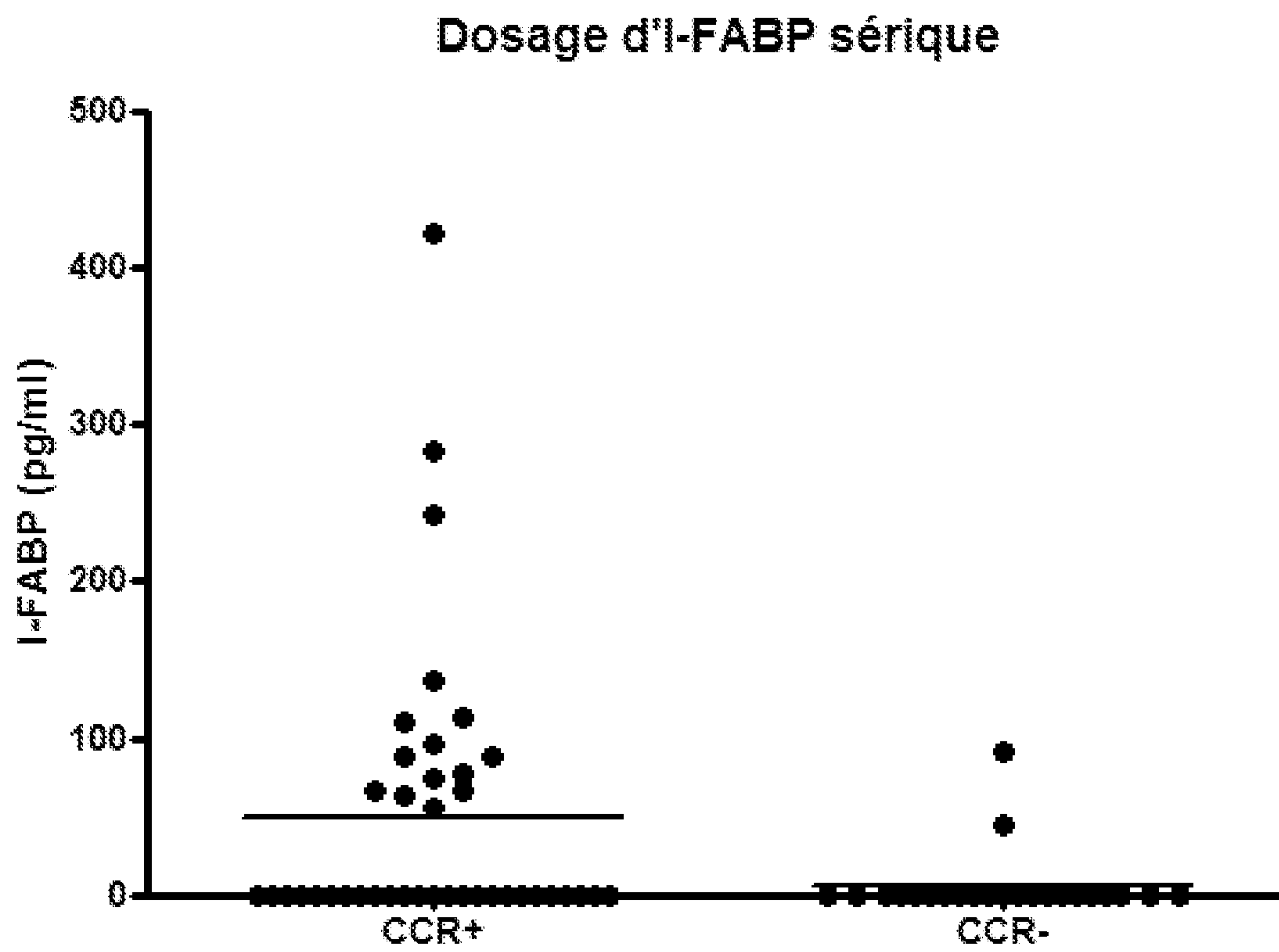


Figure 5

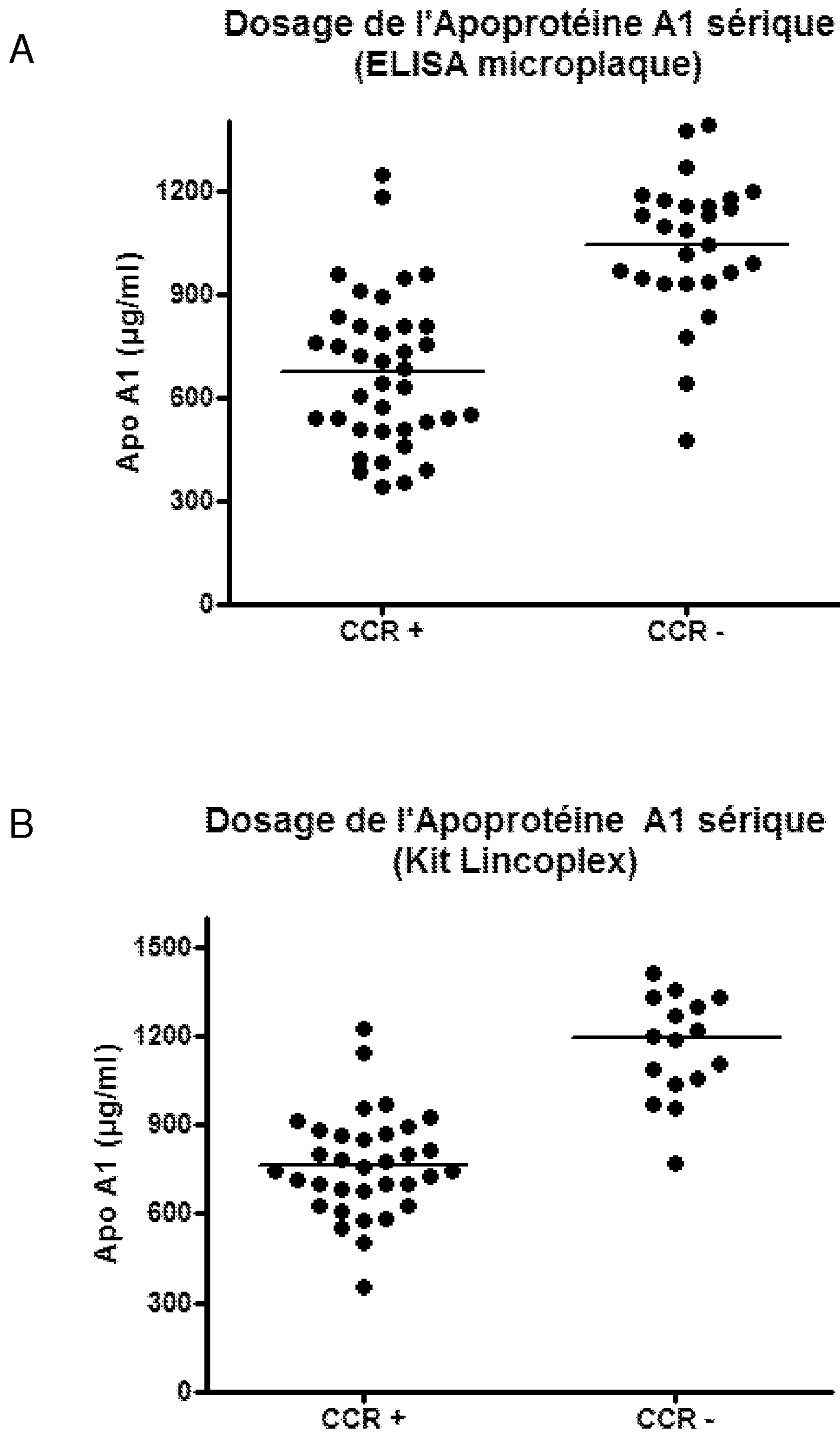


Figure 6

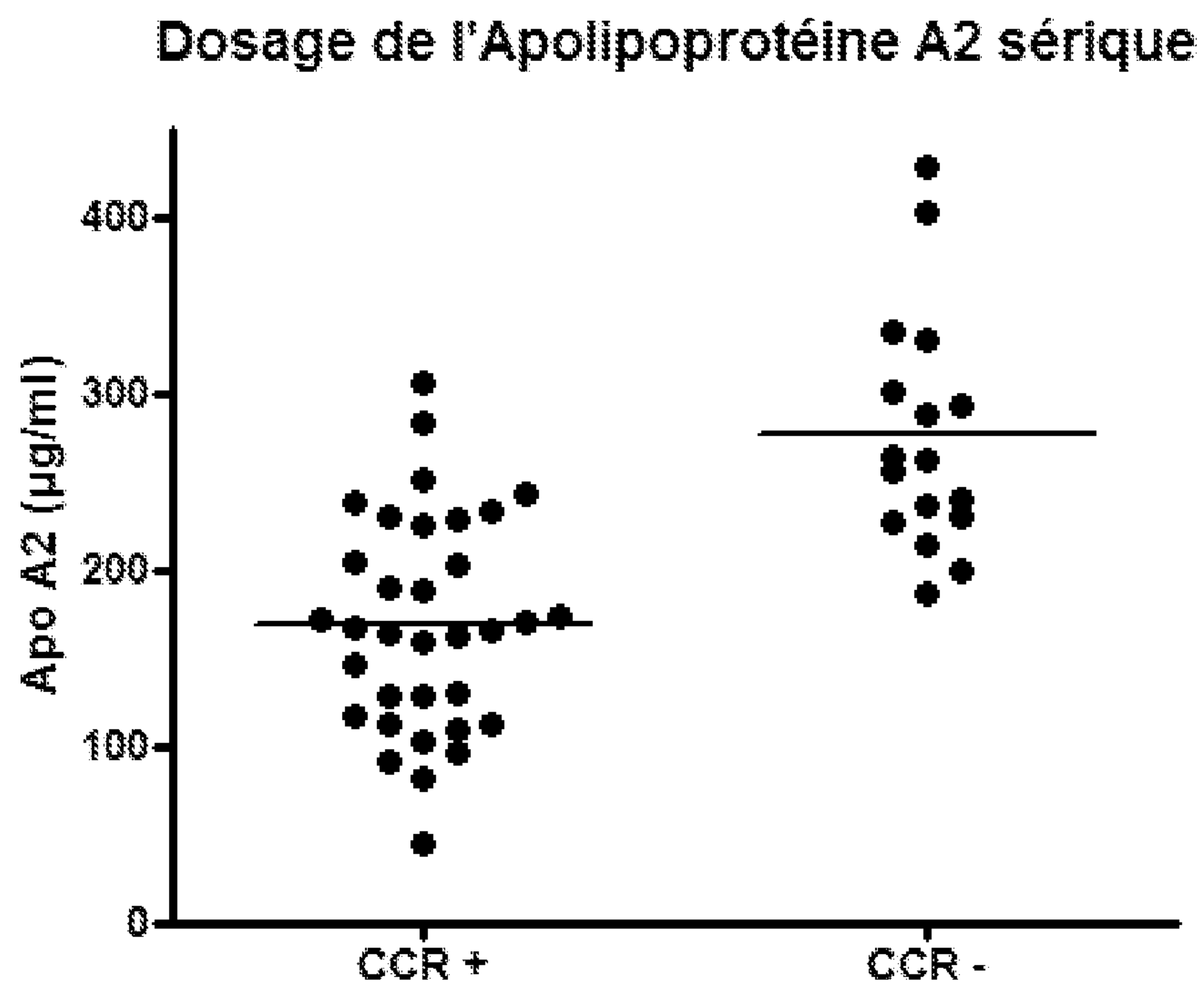


Figure 7

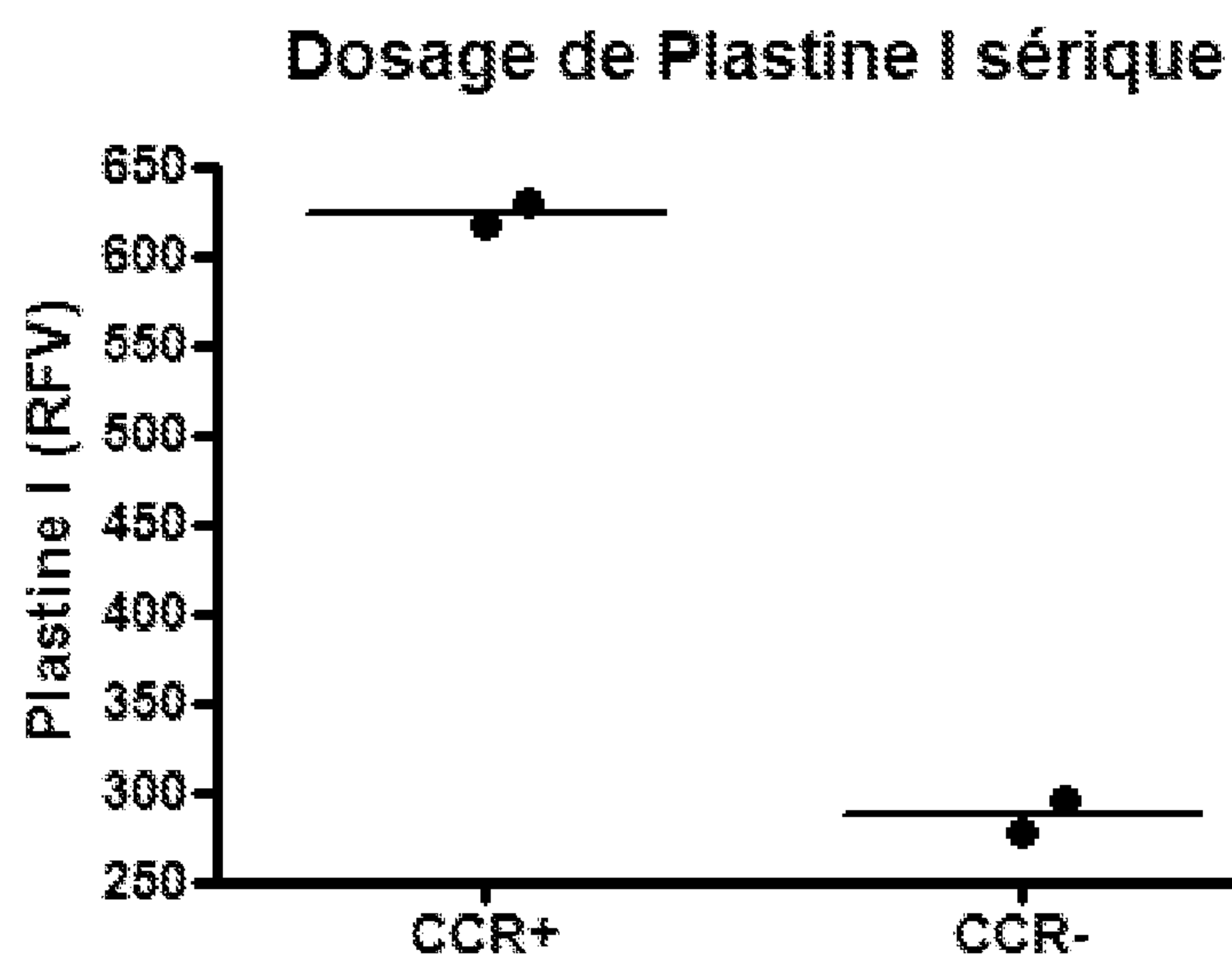


Figure 8

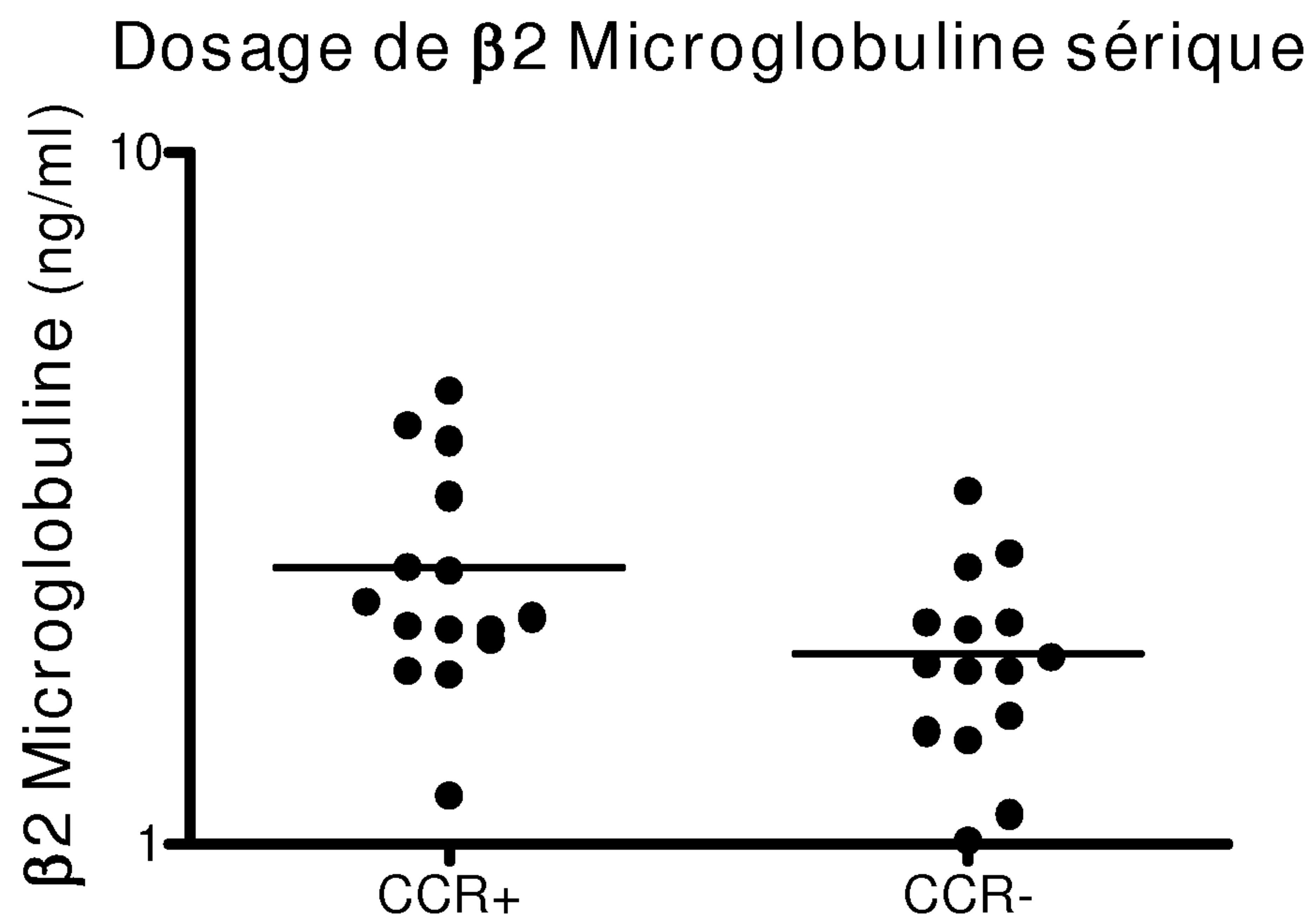


Figure 9

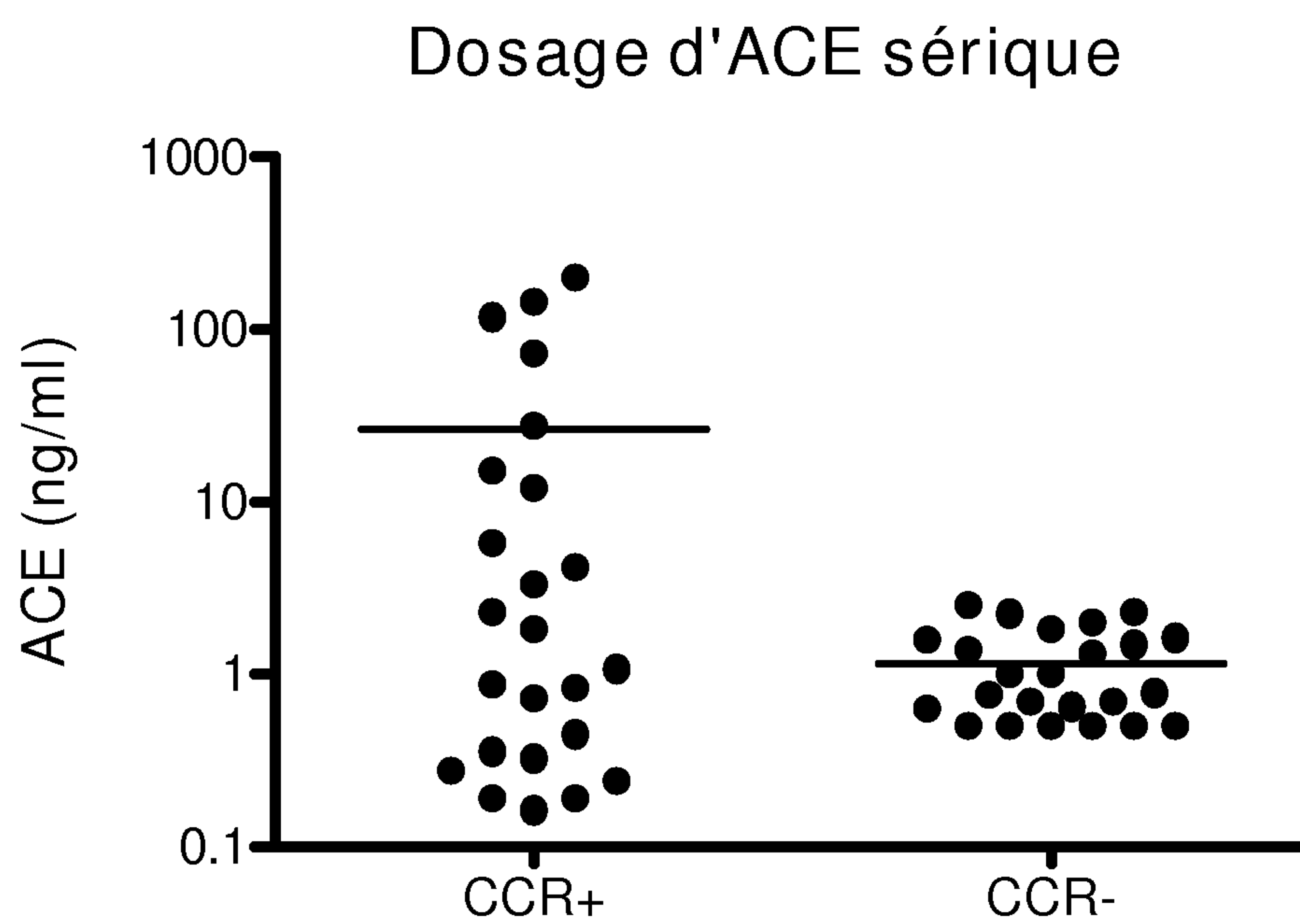


Figure 10



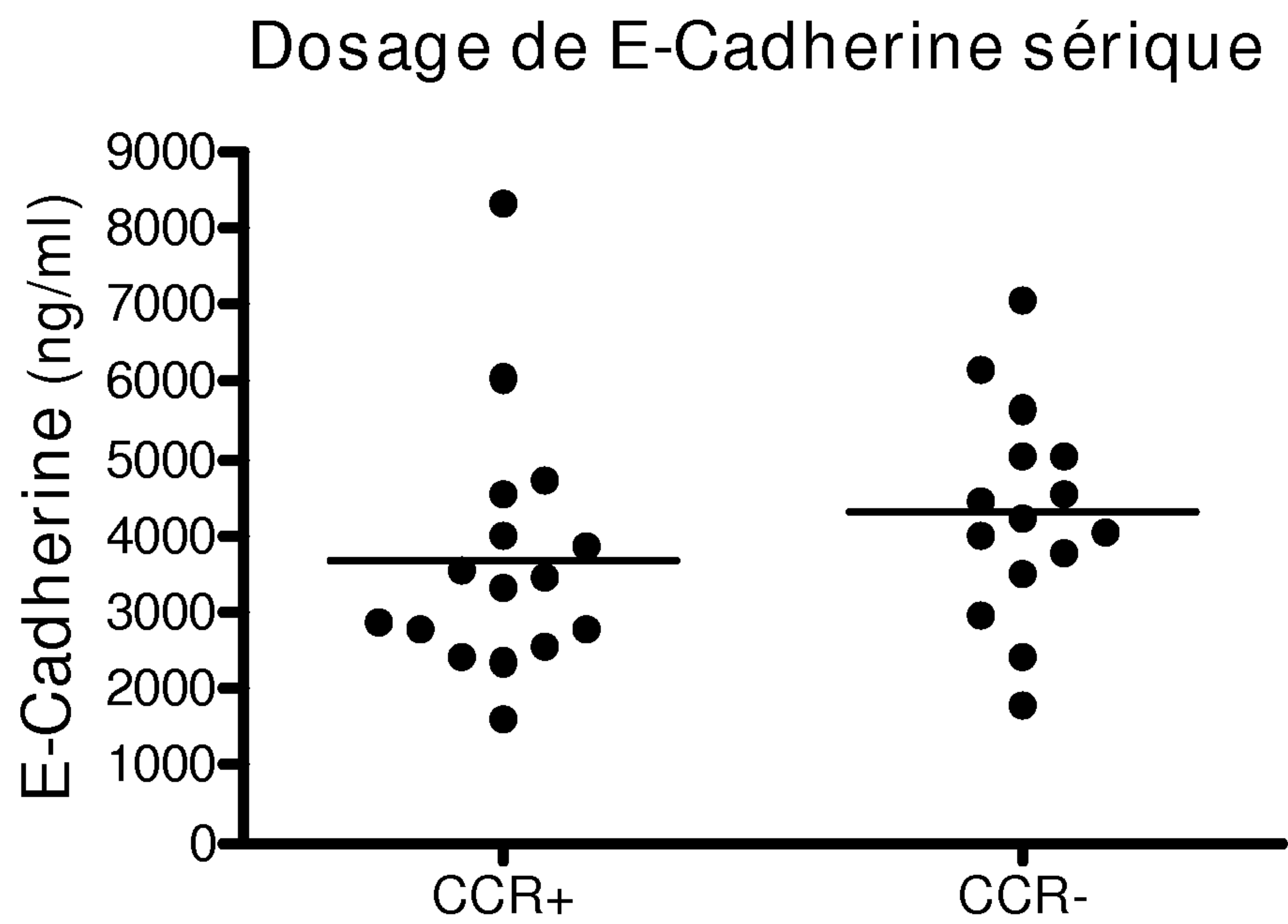


Figure 13

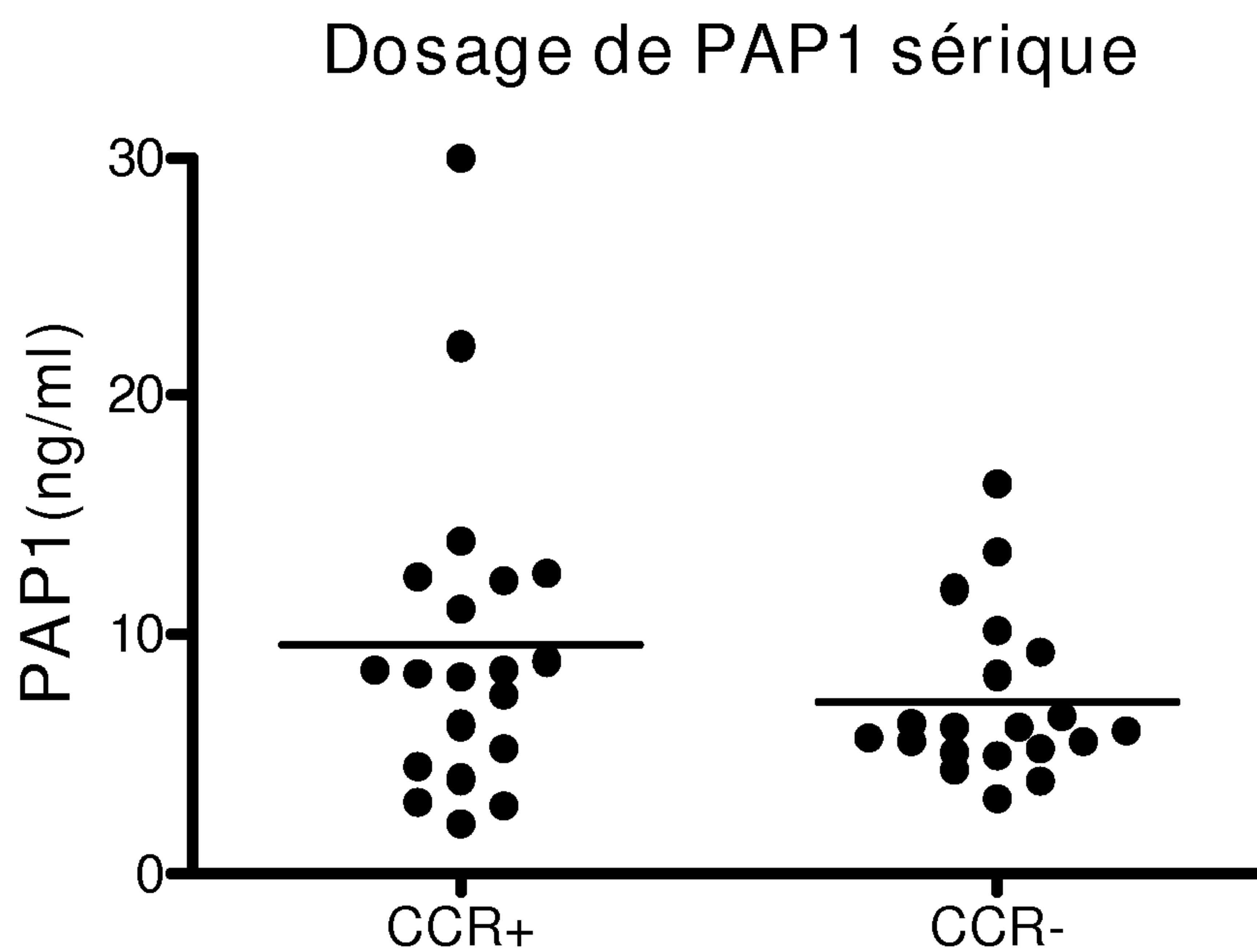


Figure 14

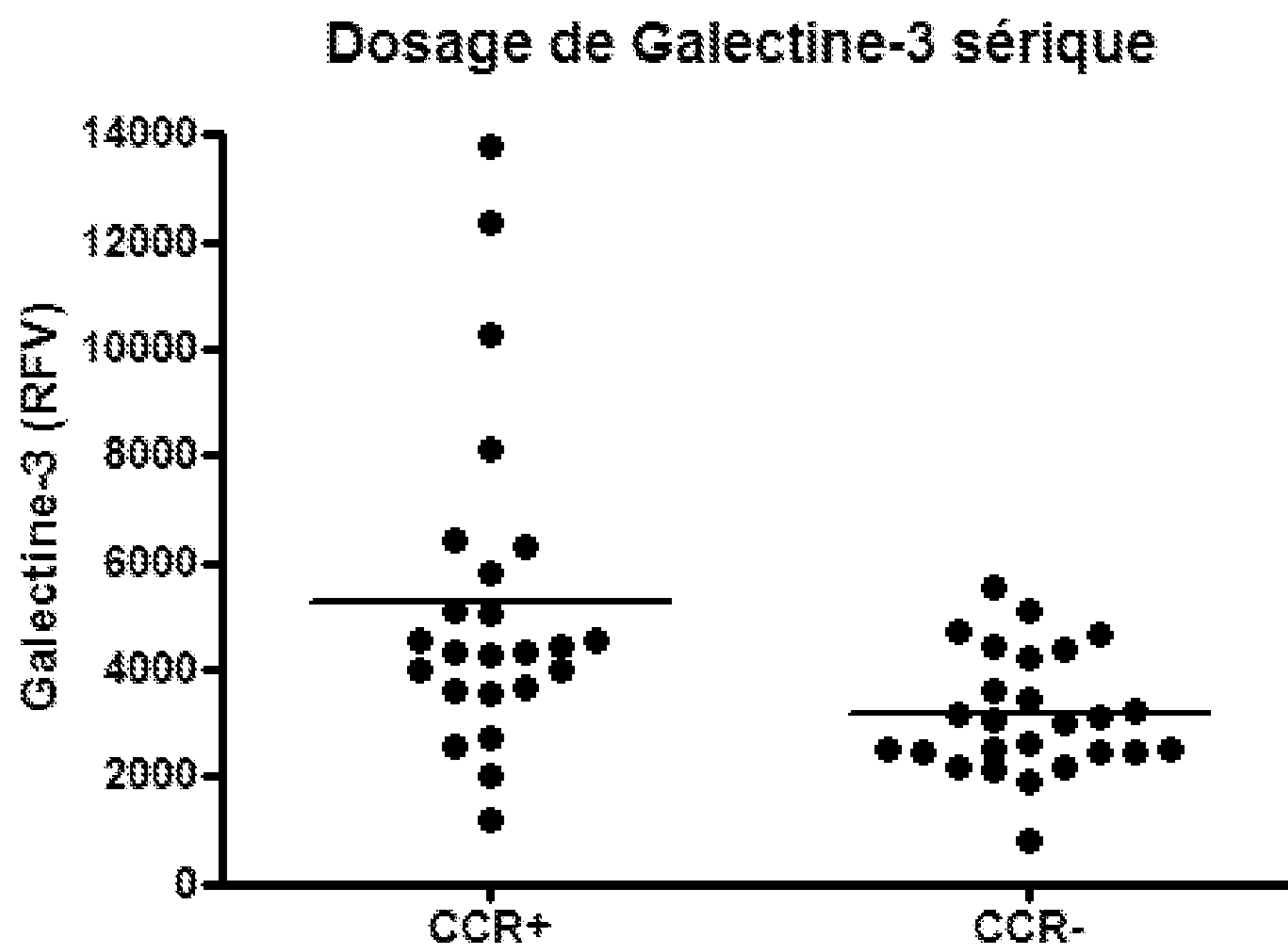


Figure 15

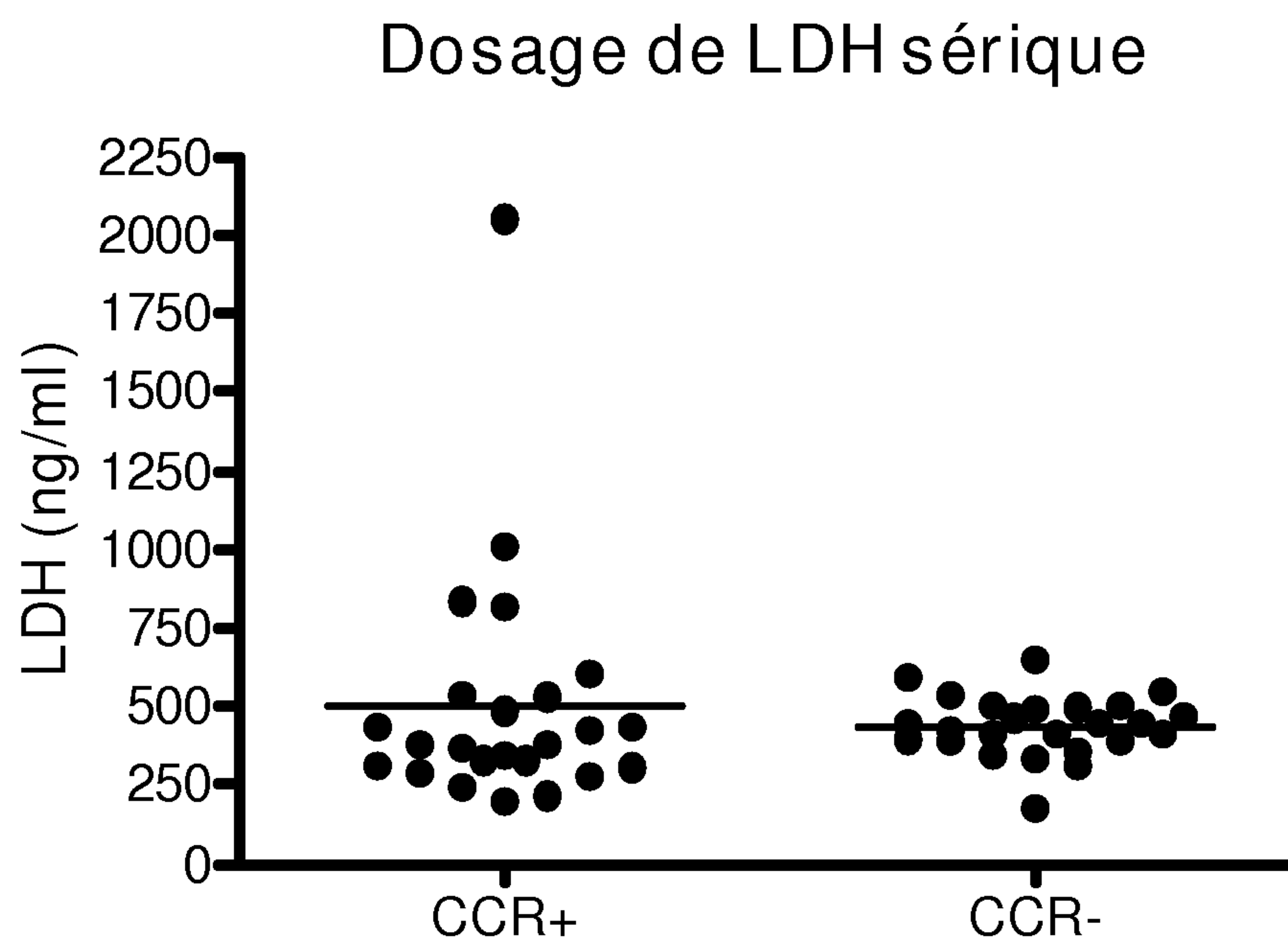


Figure 16

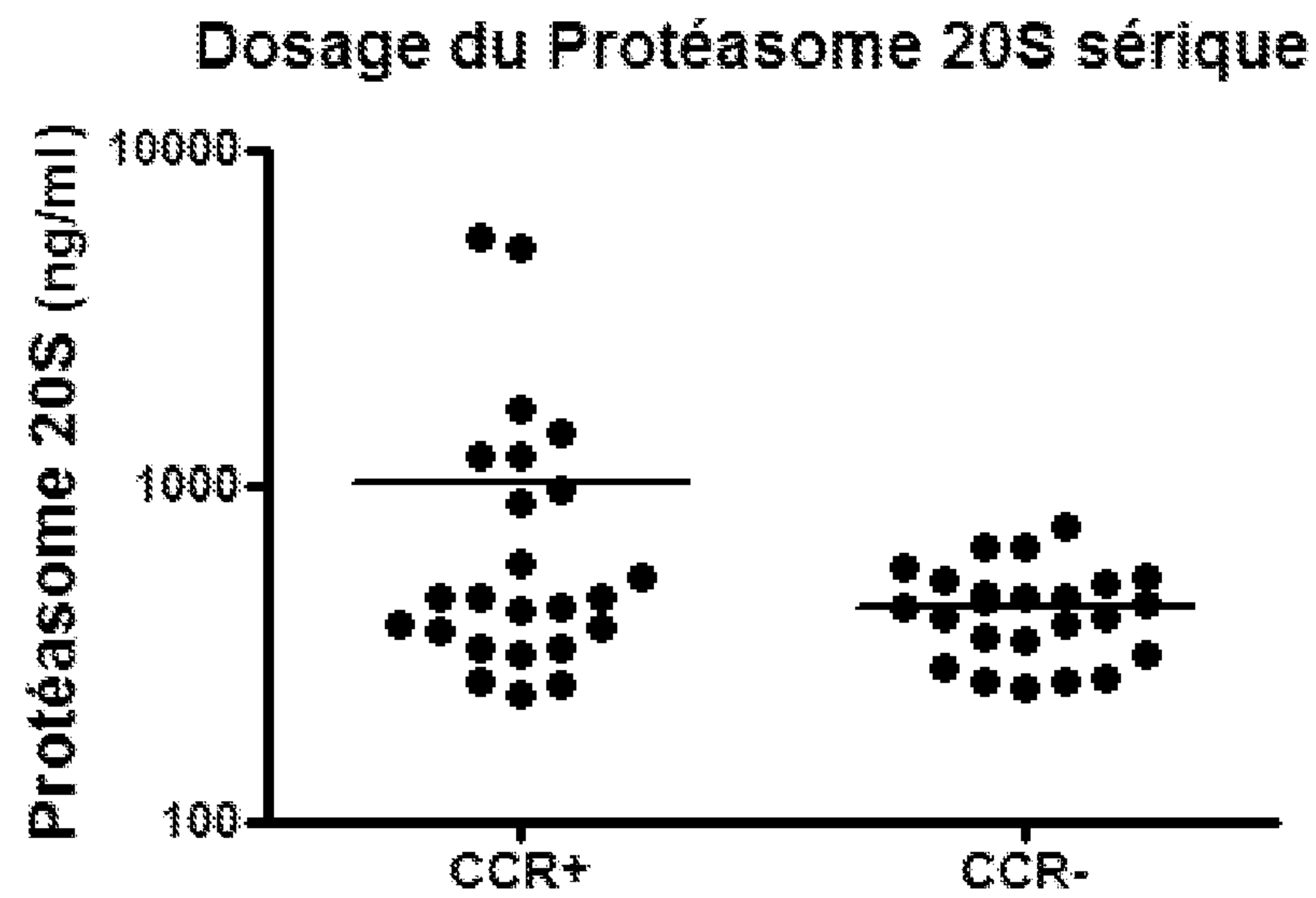


Figure 17

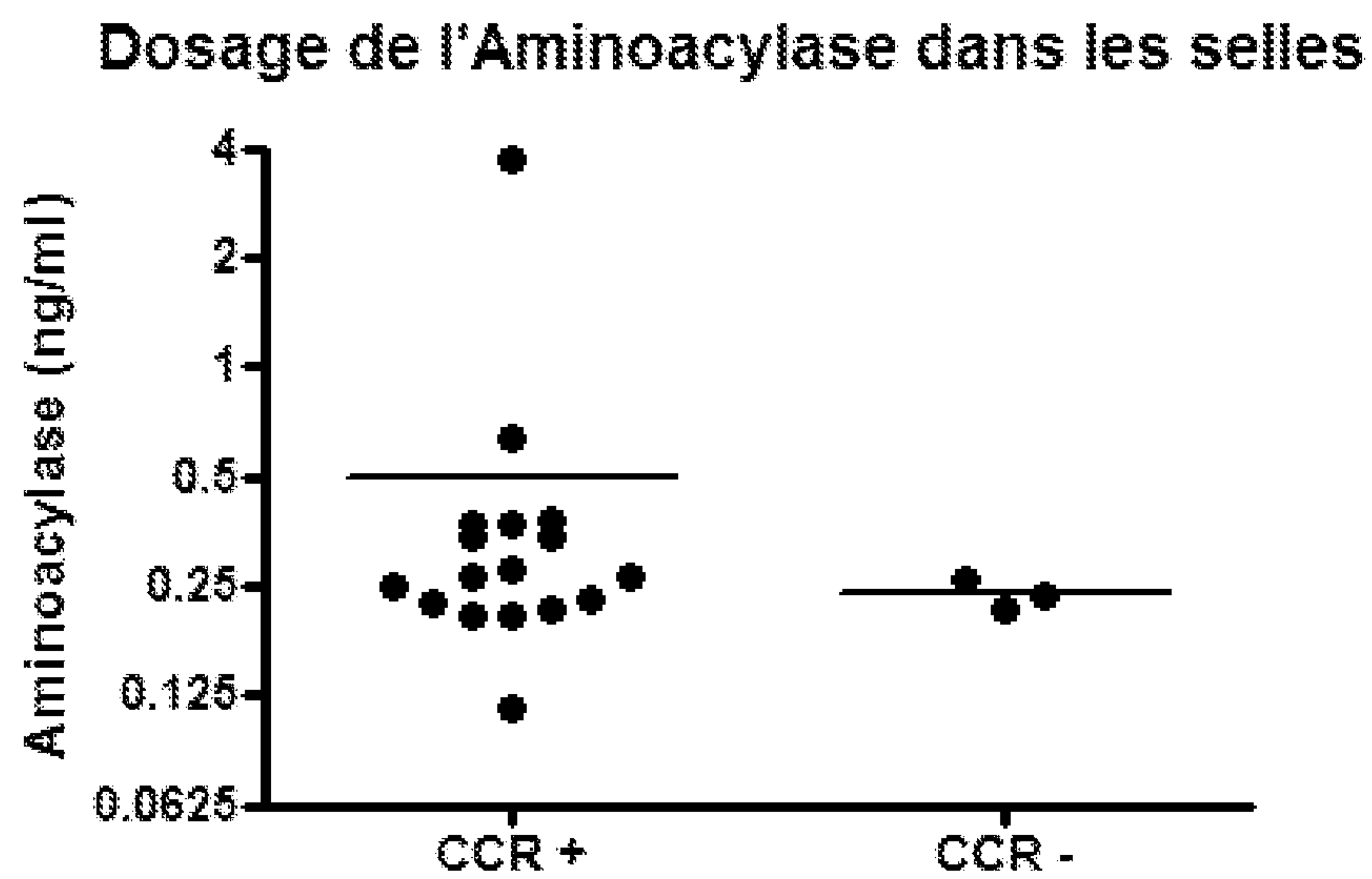


Figure 18

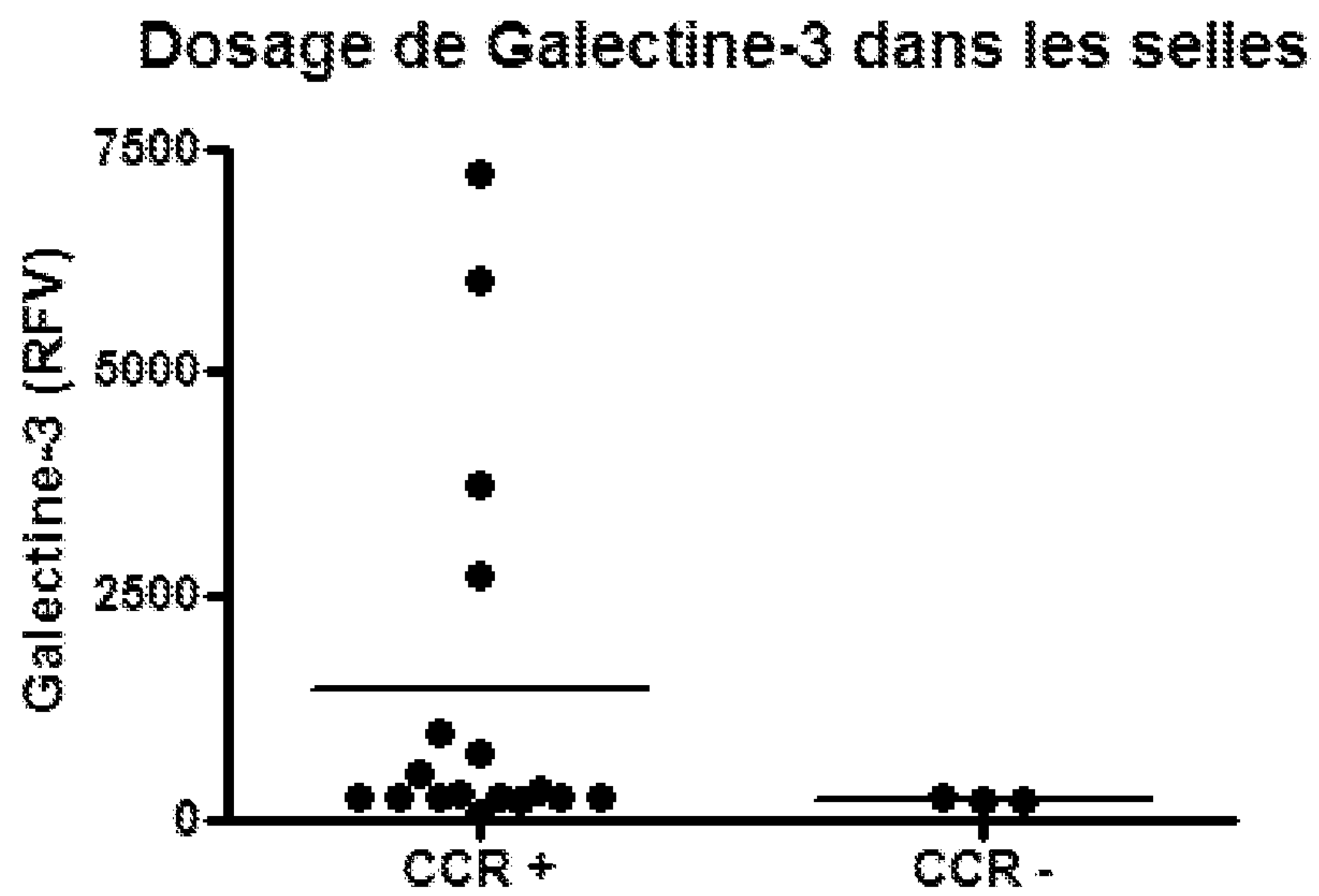


Figure 19

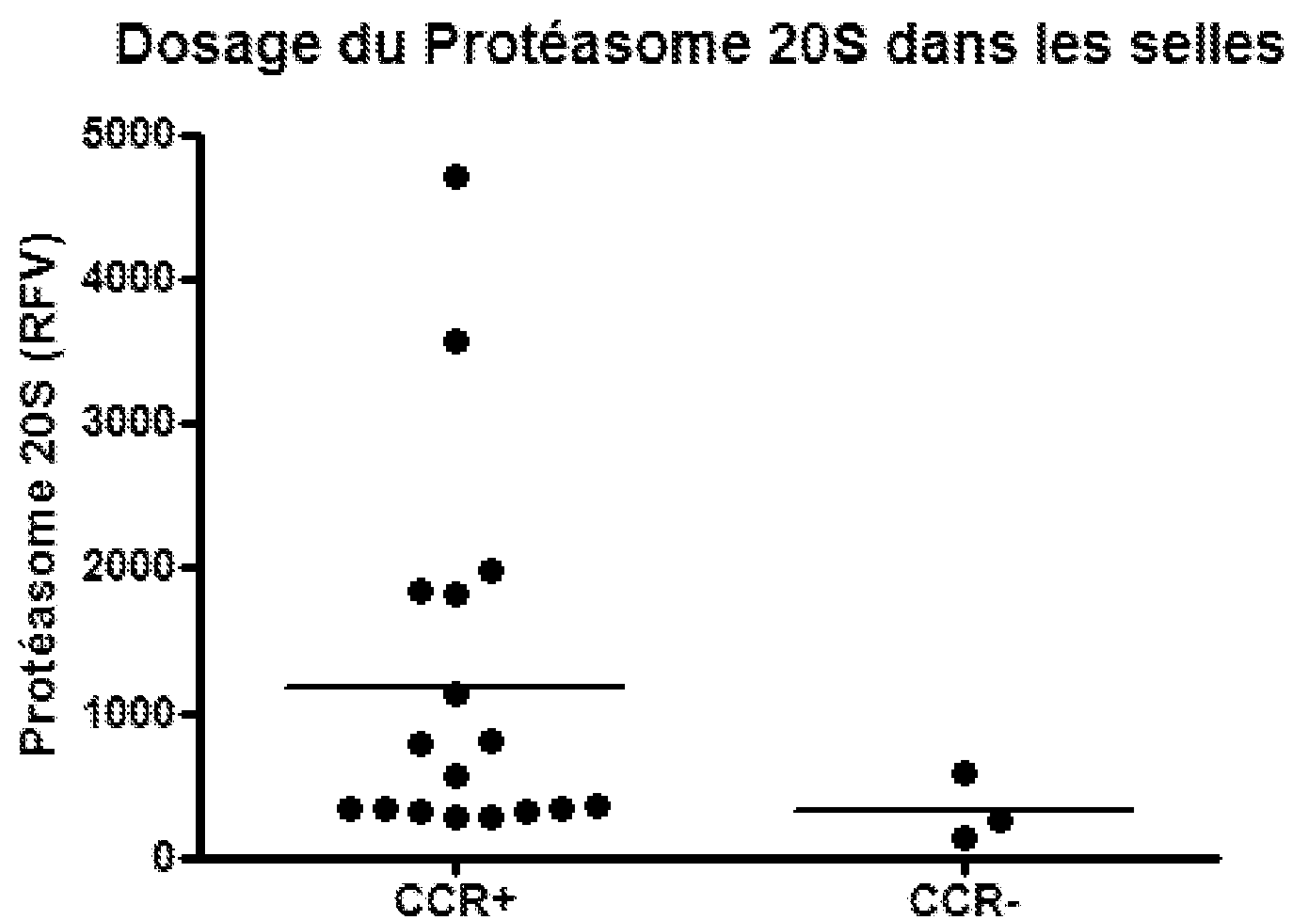


Figure 20

Sécrétion des marqueurs tumoraux par les cellules cancéreuses

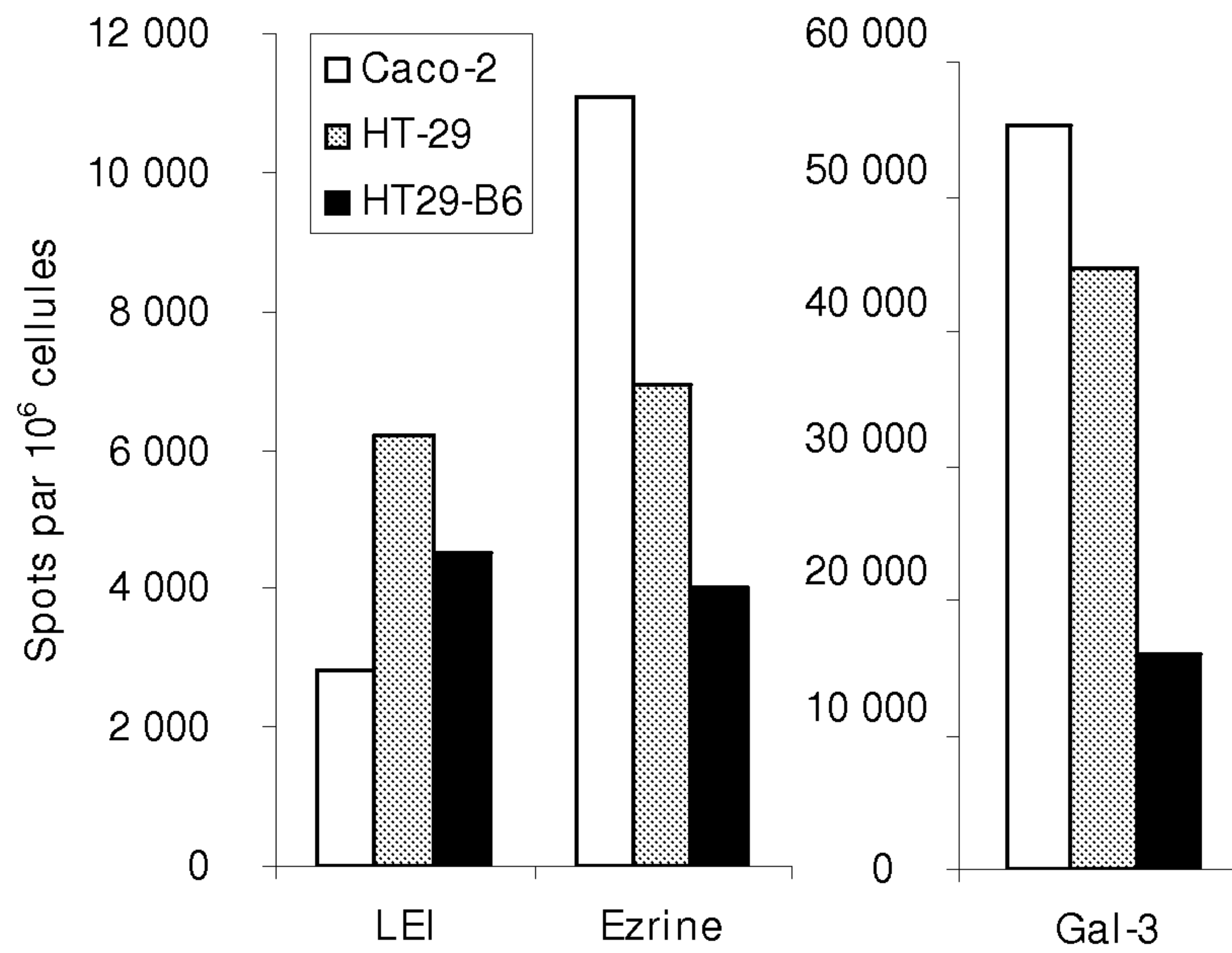


Figure 21