

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
Faculté de sciences de Luminy
163 avenue de Luminy
13288 Marseille cedex 09

Thèse de doctorat en biologie

Spécialité : Immunologie

Présentée par

KLERVI EVEN-DESRUMEAUX

Pour l'obtention du grade de docteur de l'université Aix-Marseille

**Développement d'outils innovants pour
le diagnostic et la découverte de cibles
dans le cancer du sein**

Soutenance le vendredi 25 Mai 2012

Devant le jury composé de

Dr Franck Perez	(Rapporteur)
Dr Marie-Alix Poul	(Rapporteur)
Dr Paul van Bergen en Henegouwen	(Examineur)
Pr Philippe Naquet	
Dr Patrick Chames	(Co-directeur de thèse)
Dr Daniel Baty	(Directeur de thèse)

A mon frère, Mael

SOMMAIRE

Remerciements

Abréviations

Résumé

Introduction

Partie I : Introduction générale : le cancer du sein et son diagnostic

1. <u>Généralités sur le cancer</u>	2
1.1. Qu'est ce que le cancer ?	2
1.2. Historique	2
1.3. Les différents types de cancer	3
1.4. Transformation cellulaire	3
1.4.1. Origine des cancers	6
1.4.2. Cancérogenèse	7
1.4.3. Tumorogenèse	8
1.4.4. Evolution	8
1.5. Epidémiologie	8
1.6. Facteurs de risque	9
1.7. Dépistage	10
1.8. Diagnostic	12
1.9. Traitements	12
1.10. L'immunosurveillance	13
2. <u>Le cancer du sein</u>	14
2.1. Sein normal	14
2.2. Déclenchement tumoral	15
2.3. Evolution	16
2.4. Les différents types de cancer du sein	16
2.5. Epidémiologie	18
2.6. Facteurs de risques	18
2.7. Traitements	20
2.7.1. Chirurgie	20
2.7.2. Radiothérapie	20
2.7.3. Chimiothérapie	21
2.7.4. Hormonothérapie	21
2.7.5. Immunothérapie, la belle histoire de l'herceptine	21
3. <u>Diagnostic du cancer du sein</u>	22
3.1. Dépistage	22
3.2. Le trépied du diagnostic	24

3.2.1. Examen clinique	24
3.2.2. Examen radiologique	24
3.2.3. Examen histologique	26
3.3. Pronostic	27
3.3.1. Facteurs pronostiques classiques	27
3.3.2. Facteurs pronostiques récents	28
3.4. La classification TNM	29
3.5. Diagnostic de l'état métastatique	29

<p>Partie II : Le diagnostic par détection d'antigènes : utilisation d'anticorps</p>

1. L'immunoanalyse	31
1.1. L'interaction antigène-anticorps	31
1.1.1. Définition d'un antigène et d'un anticorps	31
1.1.2. Structure des anticorps	32
1.1.3. La réaction antigène-anticorps	34
1.1.4. Notions d'affinité et de spécificité	35
1.2. Outils actuels de diagnostic immunologique	37
1.2.1. Origine de l'immunodosage	37
1.2.2. L'immunodosage par test ELISA	38
1.2.2.1. Principe	38
1.2.2.2. Méthode par compétition	38
1.2.2.3. Méthode du sandwich ou immunométrie	39
1.2.2.4. Méthodes de détection	41
1.2.2.5. Avantages et limitations	42
1.2.3. L'immunomarquage par immunohistochimie	43
1.2.3.1. Principe	43
1.2.3.2. Les tissus micro array	44
1.2.4. La cytométrie de flux	46
1.3. Les principaux antigènes circulants du cancer du sein utilisés en immunodosages	47
1.3.1. L'ACE	48
1.3.2. MUC1	49
1.3.3. Le CA 15-3	50
1.3.4. HER2	51
1.3.5. La cytokératine	52
1.3.6. La mammaglobine	52
2. Les puces à anticorps comme outil diagnostique	54
2.1. Généralités	54
2.1.1. Définition d'une puce	54
2.1.2. Puces à ADN	56
2.1.3. Puces à protéines et à anticorps	56
2.1.4. Puces fonctionnelles et analytiques	57
2.1.5. L'utilisation des puces dans le cadre du cancer du sein	59
2.2. Support de la puce	60
2.2.1. Les différents supports solides	60

2.2.2. <i>Puces en phase liquide</i>	62
2.3. Les techniques de détection	63
2.3.1. <i>Détection avec marquage</i>	63
2.3.2. <i>Détection sans marquage</i>	64
2.4. Fonctionnalisation des puces	65
2.4.1. <i>Immobilisation aléatoire par adsorption</i>	65
2.4.2. <i>L'immobilisation orientée</i>	68
2.4.3. <i>Couplage covalent</i>	69
2.2.1. <i>Avantages et limitations</i>	69
3. <u>L'immuno enrichissement pour la détection de cellules tumorales circulantes</u>	70
3.1. Historique	70
3.2. Méthodes de détection	71
3.2.1. <i>Enrichissement</i>	71
3.2.2. <i>Détection</i>	73
3.2.3. <i>Système industrielles</i>	75
3.3. Conclusions	77
4. <u>La découverte de nouveaux biomarqueurs tumoraux</u>	78
4.1. Définition d'un biomarqueur tumoral	78
4.2. Qualité d'un biomarqueur	79
4.3. Validation d'un biomarqueur	80
4.4. A ne pas confondre : antigène et biomarqueur tumoral	81
4.5. La spectrométrie de masse comme outil d'identification de biomarqueurs	82

Partie III : Des outils efficaces
--

1. <u>Les anticorps sous toutes leurs formes</u>	85
1.1. Les anticorps monoclonaux	85
1.1.1. <i>Isolement de nouveaux anticorps : la technique de l'hybridome</i>	85
1.1.2. <i>La production</i>	86
1.2. Les anticorps recombinants	87
1.2.1. <i>Historique et description des différents formats</i>	87
1.2.2. <i>Les banques d'anticorps recombinants</i>	89
1.3. Les anticorps simple domaine de camélidés	91
1.3.1. <i>Historique</i>	91
1.3.2. <i>Description des VHHs</i>	91
1.3.3. <i>Propriétés des VHHs</i>	93
1.3.4. <i>La construction de banques de VHHs</i>	94
1.3.5. <i>Applications des VHHs</i>	95
1.3.5.1. <i>Utilisation des VHHs en imagerie in vivo</i>	96
1.3.5.2. <i>Utilisation en immunothérapie</i>	97
1.3.5.3. <i>Les VHHs comme intrabodies</i>	97
1.3.5.4. <i>Les VHHs pour l'immunocapture</i>	98
1.3.5.5. <i>La neutralisation de virus</i>	98
1.3.5.6. <i>Le ciblage d'haptènes</i>	99

1.3.5.7.	La cristallographie	99
1.3.5.8.	Le ciblage de toxines	100
2.	<u>Le phage display</u>	101
2.1.	Introduction	101
2.2.	Phages filamenteux	102
2.3.	Principe général du phage display	105
2.4.	Stratégies de sélection	106
2.4.1.	<i>Utilisation de différents phages helpers</i>	106
2.4.2.	<i>Immobilisation orientée et conformationnelle de la cible</i>	107
2.4.3.	<i>Stratégies d'éluion spécifique</i>	108
2.4.4.	<i>Elimination des phages non désirés par déplétion</i>	108
2.4.5.	<i>Association affinité / infectiosité</i>	108
2.5.	Applications	109
2.5.1.	<i>Interactions protéines-protéines</i>	109
2.5.2.	<i>Spécificité enzymatique et inhibition</i>	110
2.5.3.	<i>Isolement d'anticorps</i>	110
2.5.4.	<i>Identification d'épitopes</i>	111
2.5.5.	<i>Récepteurs membranaires</i>	112
2.5.6.	<i>Sélection in vivo</i>	112
2.6.	Les autres systèmes de sélection	113
	<i>Entracte</i>	115

Résultats et Discussion

Partie I : L'immobilisation des anticorps simple domaine

1.	<u>Introduction : Une immobilisation forte et orientée</u>	120
2.	<u>Article 1</u>	121
3.	<u>Discussion</u>	122

Partie II : L'isolement de nouveaux anticorps spécifiques
--

1.	<u>Introduction : Une sélection masquée efficace et spécifique</u>	124
2.	<u>Article 2</u>	125
3.	<u>Discussion</u>	126

Partie III : Utilisation des sdAbs pour le diagnostic du cancer du sein
--

1. <u>Introduction : L'utilisation des sdAbs dans différentes applications</u>	129
2. <u>Article 3</u>	130
3. <u>Discussion</u>	131

Partie IV : L'utilisation des sdAbs comme nano marqueurs

1. <u>Introduction : L'association sdAbs/QDots comme outil diagnostique</u>	136
2. <u>Article 4</u>	137
3. <u>Discussion</u>	138

Conclusions et perspectives

1. <u>Conclusion et discussion</u>	142
1.1. L'identification de cibles	143
1.2. La réalisation des masques	147
2. <u>Perspectives</u>	147
2.1. Du modèle au test clinique	147
2.2. L'utilisation du système à haut débit	148
2.3. La sélection masquée : une stratégie possible dans de nombreuses applications	149

<i>Annexe</i>	153
---------------	-----

<i>Références bibliographiques</i>	154
------------------------------------	-----

Remerciements

Au terme de ce doctorat, je tiens à remercier en tout premier lieu Patrick Chames qui a dirigé cette thèse. Tout au long de ces quatre années, il a su orienter mes travaux tout en m'apprenant à réfléchir par moi-même et en me faisant découvrir le monde de la recherche. Je le remercie pour son écoute, sa disponibilité, sa patience ainsi que l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer. Il a toujours su me donner de l'inspiration dans mon travail et me redonner espoir dans les moments difficiles. Je le remercie également pour avoir encouragé les échanges avec différents chercheurs et laboratoires, ainsi que pour avoir soutenu ma participation dans de nombreux congrès.

Je tiens à remercier sincèrement Daniel Baty pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire. Je le remercie tout d'abord pour son accueil lors de mon stage de Master mais principalement pour avoir eu confiance en moi à l'issue de mon stage en me proposant de réaliser une thèse dans son équipe. Je ne me serais peut-être jamais lancée dans cette aventure sans la confiance qu'il a mise en moi et le courage qu'il m'a apporté. Je tiens donc à le remercier tout particulièrement car pour rien au monde je ne voudrais revenir en arrière.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur soutien scientifique et leur aide et surtout pour avoir réussi à créer une super ambiance au sein et en dehors du laboratoire, qui a contribué à l'élaboration de cette thèse ainsi qu'à la réussite de ces formidables années. Tout d'abord, Julie Matz, qui en dehors de son soutien scientifique et de son écoute dans les moments difficiles, est devenue mon amie et m'a initiée à l'escalade et la randonnée. Je n'oublierai jamais toutes les escapades que nous avons faites et qui m'ont permis de décompresser et de découvrir des merveilles. Je tiens ensuite à remercier Brigitte Kerfelec, pour son aide scientifique bien sûr, mais aussi pour son écoute, son calme et sa capacité à toujours trouver les bons mots pour me calmer et me redonner le moral. Merci également à Amélie Cornillon qui au début de ma thèse a su m'aider, me soutenir et me former. J'ai également une pensée particulière pour Martine Chartier, qui a su me former dès mon arrivée au laboratoire et me montrer toutes les ficelles du métier. Je remercie également Katia Bouton, qui a fait, tout au long de ma grossesse, toutes les manipulations que je ne pouvais plus faire, et qui plus est, toujours avec le sourire. Je souhaite remercier également Damien Nevoltris, qui est arrivé pendant ma dernière année de thèse, et qui par son

enthousiasme m'a fait passer de superbes moments mais surtout a su réveiller ma curiosité un peu essoufflée en cette fin de thèse par ses innombrables questions et remarques.

Je souhaite également remercier tout les membres présents et passés de l'ATI team, Caroline Rozan, Marc Turini, Elise Termine, Lauren Agnelli, Stéphane Bonetto, Benjamin Lombard, Corinne Pétiard. Je les remercie tous pour leur aide, leur bonne humeur, et toutes les bonnes choses qu'ils ont pu m'apporter.

Je souhaite évidemment remercier toutes les personnes de l'anciennement nommée U624 pour la bonne ambiance qui a régné tout au long de ces années, et pour toutes les succulentes parties pâtes du vendredi midi. Une pensée particulière pour Thomas Bonacci et Tewfik Hamidi, avec qui j'ai partagé de superbes moments.

Merci à tous les partenaires de ces projets, Patrick Fourquet, Matthieu Pophillat, Stéphane Garcia, Igor Nabiev, Jacques Cohen, Brigitte Reveil, pour les collaborations enrichissantes entretenues au cours de ces années. Je remercie tout particulièrement Gilles Rousserie, pour son aide scientifique et son amitié et Marie-Noelle Lavaut, pour m'avoir formée en immunohistochimie mais surtout pour toutes les conversations passionnantes que nous avons eues, dans son laboratoire au soleil...

Je tiens également à remercier toute ma famille, et particulièrement ma mère et ma sœur, pour leur soutien constant tout au long de mes études et de mon doctorat. Je remercie également Julien, mon mari, pour son soutien total en mon projet professionnel actuel et futur et pour toute l'aide qu'il m'apporte afin que je puisse travailler dans les meilleures conditions. Je remercie aussi bien évidemment ma petite merveille, Lou, qui m'apporte tellement de bonheur chaque jour, mais pour elle, aucun mot n'est à la hauteur...

Je remercie les rapporteurs de cette thèse Marie-Alix Poul et Franck Perez pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury, Paul van Bergen en Henegouwen et Philippe Naquet qui ont accepté de juger ce travail.

Merci à l'ANR (Association National pour la Recherche) et à l'ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer) pour le soutien financier à cette thèse doctorale.

Enfin merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées ici et qui se reconnaîtront dans ces quelques lignes.

Abréviations

Ac = Anticorps

ACE = Antigène Carcino Embryonnaire

ADN = Acide Déoxyribonucléique

ADNc = AND complémentaire

AFM = Atomic Force Microscopy

Ag = Antigène

BRCA1 = BReast CAncer 1

CA = Cancer Antigen ou Carbohydrate antigen

CBA = Cytometric Bead Array

CCD = Charge-Coupled Device

CCIS = Cancers Canalaires In Situ

CDR = Complementarity Determining Regions

CH = Constant domain of Heavy chain

CHO = Chinese Hamster Ovary

CL = Constant domain of Light chain

CMNS = Cellules MonoNucléées Sanguines

CTC = Circulating Tumoral Cell

CYFRA21-1 = Cytokeratin Fragment 19

DAPI = 4',6'-diamidino-2-phénylindole

dsFv = disulfide bond stabilised Fv

DTC = Disseminating Tumoral Cell

ECD = Extra Cellular Domain

EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor

EIA = Enzyme ImmunoAssays

ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EpCAM = Epithelial Cell Adhesion Molecule

ER = Estrogen Receptor

ERE = Estrogen Responsive Element

Fab = Fragment antigen binding

Fc = Fragment crystallisable

FDA = Food and Drug Administration

FFDM = Full-Field Digital Mammography
HBV = *Hepatitis B Virus*
HCAb = Heavy Chain only Antibodies
HEP = Host Cell Protein
HER2 = Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
MAM = Mammaglobin
HPV = Human Papilloma Virus
HRP = HorseRadish Peroxidase
IFN γ = Interferon gamma
Ig = Immunoglobuline
Ig NAR = New antigen receptor
IHC = Immunohistochimie
IP = Immunoprecipitation
IRM = Imagerie par Resonance Magnétique
LC-MS/MS = Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
mAb = monoclonal Antibody
mGluR4 = Metabotropic Glutamate Receptor 4
mRFP = monomeric Red Fluorescent Protein
MUC1 = Mucine 1
MUC1-PEM = MUC1-polymorphic epithelial mucin
NK = Natural Killer
NKT = Natural Killer T
ORF = Open Reading Frame
PCR = Polymerase Chain Reaction
PDMS = Polydimethyl-siloxane
PEG = PolyEthylène Glycol
PMT = Photo-multiplificateurs
PR = Progesterone Receptor
PSA = Prostate Specific Antigen
QDots = Quantum Dots
RF = Replicative Form
RIA = Radio ImmunoAssays
RNA = Ribonucleic Acid
RT-PCR = Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SAM = Self Assembled Monolayers

scFv = single-chain variable Fragment

sdAb = single domain Antibody

SELDI-TOF = Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight

SH₂ = Src Homology 2

SIDA = Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis

SNF = Sucrose Non Fermentable

SPR = Surface Plasmon Resonance

TAA = Tumor Associate Antigen

TMA = Tissu Micro Array

TPA = Tissue Polypeptide Antigen

TPS = Tissue Polypeptide Specific Antigen

TSA = Tumor Specific Antigen

VH = Variable domain of Heavy chain

VHH = Variable domain of Heavy chain of Heavy chain Antibody

VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine

VL = Variable domain of Light chain

xMAP = Multi-Analyte Profiling

αFP = alpha-Fœtoprotéine

Résumé

Au cours de sa vie, 1 femme sur 9 sera atteinte du cancer du sein, 1 sur 27 succombera à cette maladie et 10 à 15 % des patientes développeront des métastases dans les trois années suivant le diagnostic. Le diagnostic précis et personnalisé des cas de cancer du sein et la détection de leur potentiel métastatique est donc un enjeu actuel majeur. Il est essentiel d'élaborer de nouvelles méthodes d'analyses permettant un suivi plus efficace du cancer du sein. Une analyse plus précise des caractéristiques moléculaires d'une tumeur primaire devrait conduire à une médecine personnalisée, un traitement et un suivi plus efficace. La détection efficace de biomarqueurs sériques serait un moyen de diagnostiquer un cancer métastatique et de modifier le traitement en fonction de ces résultats. L'analyse protéomique d'échantillons de patient pour la découverte de nouveaux biomarqueurs a un fort potentiel mais souffre de limitations techniques. L'isolement rapide d'une grande variété d'anticorps monoclonaux et reconnaissants des marqueurs tumoraux d'intérêt pour la mise au point de tests diagnostiques spécifiques et sensibles représente un goulet d'étranglement.

Par l'utilisation de fragments d'anticorps innovants aux propriétés remarquables nommé *single domain antibody* (sdAb), et grâce à la mise au point d'une nouvelle stratégie innovante de phages display, ce travail apporte d'importantes réponses en termes de disponibilité d'anticorps, d'analyse protéomique spécifique d'échantillon et de découverte de nouvelles cibles. Nous avons élaboré une stratégie permettant simultanément la découverte de biomarqueurs spécifiques et l'isolement des anticorps correspondants. Après la construction de banques de sdAb à partir de lamas immunisés par des biopsies, une nouvelle stratégie de sélection *in vitro* par phage display, la sélection masquée, nous a permis d'isoler des anticorps spécifiques du cancer du sein. Après sélection, nous avons démontré la possibilité d'utiliser ces sdAbs isolés dans de nombreuses applications allant de tests classiques comme l'ELISA ou l'immunohistochimie, mais également pour des tests plus innovants comme la réalisation d'une puce à sdAbs pour l'analyse multiplexé d'antigènes dans un échantillon complexe ou encore l'enrichissement de cellules rares par cytométrie de flux. Les résultats obtenus pourraient à terme permettre le diagnostic protéomique personnalisé efficace d'échantillons de patientes à grande échelle.

Introduction

Partie I :

Introduction générale : le cancer du sein et son diagnostic

1. Généralités sur le cancer

1.1. Qu'est ce que le cancer ?

Le mot cancer est un mot latin, qui signifie crabe ou écrevisse. Tout comme le crabe qui représente plusieurs espèces, le cancer comprend près de deux cents maladies différentes, toutes caractérisées par une croissance incontrôlée de cellules. Quand des cellules normales sont endommagées et qu'elles ne peuvent pas être soignées, elles meurent : c'est l'apoptose. Les cellules cancéreuses ne meurent pas et continuent de se développer. Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale et anémique au sein d'un tissu normal de l'organisme, engendrant le développement de tumeurs qui échappent aux règles de fonctionnement du corps. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer de leur lieu de production et former des métastases. Pour ces deux raisons, le dépistage du cancer doit être le plus précoce possible.

1.2. Historique

Le cancer n'est pas une maladie récente. Des cancers étaient déjà décrits dans des écrits égyptiens 3500 ans avant J.-C. Sur quelques momies égyptiennes datant de -2500 ans, on a diagnostiqué des tumeurs osseuses. Des papyrus laissés par des médecins décrivent avec précision le cancer du col utérin, aujourd'hui encore le plus fréquent dans ce pays, et le cancer du sein. Des stigmates de cancer des os ont même été retrouvés sur des squelettes de grands reptiles de l'ère tertiaire. C'est Hippocrate (Fig. 1) qui donna la première définition de la maladie, appelée alors « *carcinome* » ou « *squirre* » : une tumeur (gonflement) dure, non-inflammatoire, ayant tendance à récidiver et se généraliser jusqu'à la mort.

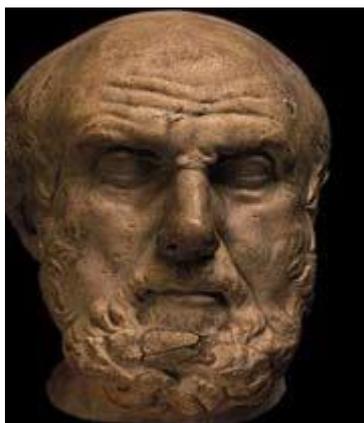


Figure 1 : Hippocrate

1.3. Les différents types de cancer

On distingue trois types de cancers : les carcinomes qui correspondent au cancer d'un épithélium, c'est-à-dire une surface composée uniquement de cellules ; les sarcomes qui sont des cancers proliférant dans des tissus « de support » comme les os ; et les cancers hématopoïétiques qui touchent les cellules sanguines. On peut ensuite classer ces cancers selon les organes touchés (sein, pancréas, prostate, ...). Il existe presque autant de sources de cancer que de tissus dans l'organisme, certains étant toutefois plus fréquents que d'autres.

1.4. Transformation cellulaire

Durant toute la vie cellulaire, notre patrimoine génétique (l'acide désoxyribonucléique ou ADN) est soumis à des agressions. Dans la majeure partie des cas, ces modifications de l'ADN passent inaperçues car des mécanismes réparateurs corrigent ces défauts. Pourtant, dans de rares cas, une mutation peut atteindre et modifier la structure d'un gène spécifiant un facteur qui règle le contrôle de la multiplication cellulaire (oncogène ou gène suppresseur de tumeur). Dans ce cas, la cellule peut acquérir un avantage sélectif qui lui permettra de donner naissance à un premier clone de cellules anormales (lésion précancéreuse). Dans ces cellules qui ont un avantage sélectif, la probabilité qu'une seconde mutation apparaisse et soit sélectionnée est plus importante. Dans ce cas, une seconde population sera générée, plus anormale que la première et qui va se développer à ses dépens. On peut ainsi, par diverses étapes successives, accumuler plusieurs mutations, chacune d'entre elles permettant la sélection d'un clone de plus en plus malin pour finir par une cellule hautement cancéreuse

(Fig. 2). La progression tumorale correspond donc à un processus dynamique qui, à chaque étape, sélectionne une nouvelle cellule ayant subi une ou plusieurs altérations. La transformation cellulaire correspond au passage d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse.

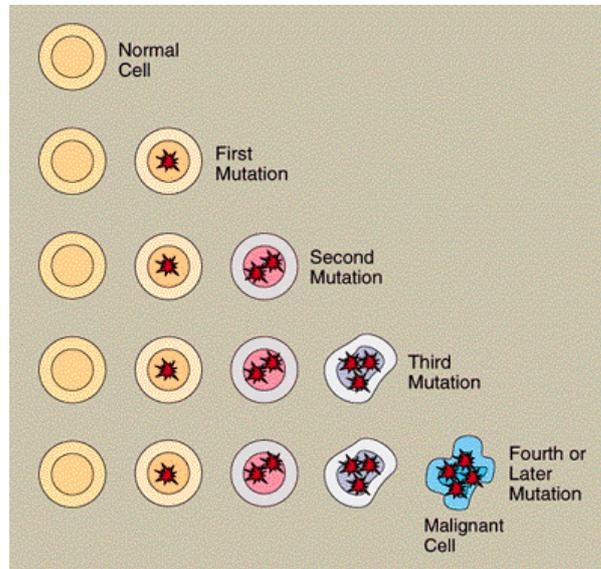


Figure 2 : Formation d'un cancer (<http://www.accessexcellence.org>)

Contrairement aux pathologies génétiques comme la mucoviscidose ou les myopathies qui sont des pathologies monogéniques (un seul gène est généralement altéré), le cancer est une pathologie multigénique. Ces altérations se produisent de manière successive, chacune d'entre elles favorisant la suivante. Cette suite d'altérations se produit généralement sur une très longue plage chronologique de 5 à 20 ans. Ces altérations ne sont pas aléatoires et c'est cette très grande diversité génétique qui est à la base de l'hétérogénéité de la pathologie cancéreuse. En 2000, R. Weinberg et D. Hanahan ont suggéré que la transformation cellulaire passe par l'acquisition d'au moins six propriétés (Hanahan and Weinberg 2000) (Fig. 3) :

1. Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération. Les cellules normales ne se divisent que lorsqu'elles reçoivent un stimulus particulier. Les cellules tumorales n'ont plus besoin de ce signal.
2. Insensibilité aux signaux inhibiteurs, antiprolifératifs
3. Résistance à l'apoptose ou mort cellulaire programmée. En cas de stress ou d'anomalie ne pouvant pas être éliminée, une cellule normale se suicide en utilisant l'apoptose. Les cellules tumorales ont inactivé tous ces mécanismes pour mieux survivre.

4. Capacité proliférative illimitée. Le nombre usuel de divisions cellulaires pour une cellule humaine est de 50 à 60 (sénescence cellulaire, *limite de Hayflick*), après quoi elle cesse de pouvoir se diviser. Les cellules tumorales continuent de se diviser sans limite visible grâce à l'activité de la télomérase qui est fortement augmentée dans la plupart de ces cellules.

5. Capacité à stimuler l'angiogénèse. Les cellules tumorales (et la tumeur) ont un besoin important en oxygène pour survivre. Elles vont donc stimuler/provoquer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'oxygéner la tumeur.

6. Acquisition d'un pouvoir invasif. Les cellules tumorales sont capables de passer à l'intérieur d'un vaisseau sanguin afin d'être transportées dans un autre organe où elles vont générer une seconde tumeur (métastase)

Plus récemment, deux nouvelles propriétés y ont été ajoutées : la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement à la destruction par le système immunitaire (Hanahan and Weinberg 2011).

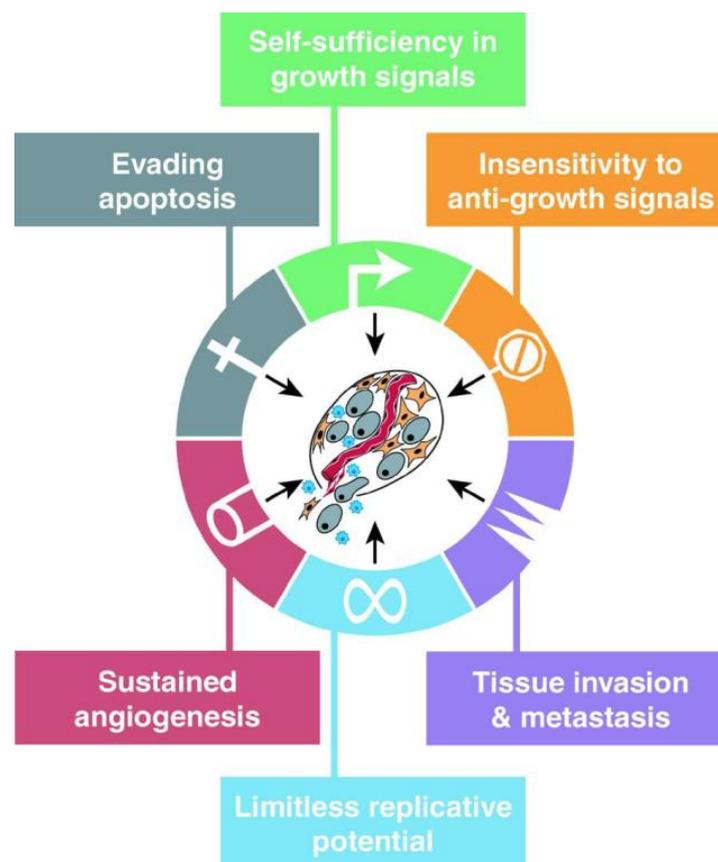


Figure 3 : Les acquisitions d'un cancer, les 6 caractéristiques des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg 2000)

1.4.1. Origine des cancers

Environ 15 % des cancers humains peuvent être associés à des agents infectieux. Cela peut être des virus comme l'hépatite B (HBV) pour le cancer du foie ou le papillomavirus humain (HPV) pour le cancer du col de l'utérus, plus rarement des bactéries (*Helicobacter* et cancer gastrique) ou, encore plus rarement, des parasites (Schistosomes et cancer du foie). L'agent infectieux n'intervient qu'à une étape du processus de transformation cellulaire. Dans tous ces cas, outre l'infection, on trouve également des altérations dans les cellules tumorales impliquant certaines classes précises de gènes.

La première classe comprend les oncogènes (Bertram 2000 ; Hanahan and Weinberg 2000), qui codent pour des protéines intervenant dans la signalisation cellulaire qui stimule la prolifération, telles que des protéines kinases, des facteurs de transcription ou des récepteurs à des facteurs de croissance. Ils deviennent hyperactifs et leur modification est dominante car il suffit qu'une des deux copies du gène soit modifiée. Ces gènes tumoraux sont obtenus suite à la modification du gène normal (appelé proto-oncogène) par mutation, translocation chromosomique ou amplification génique. On a identifié actuellement plus de 100 oncogènes. La famille de gènes *ras*, codant des protéines de transduction du signal, fait partie des premiers oncogènes découverts et est l'oncogène le plus largement activé dans les cancers. Les mutations observées dans ces gènes permettent une activation incontrôlée de la prolifération cellulaire (Fernandez-Medarde and Santos 2011). La découverte des oncogènes a été la première à permettre de différencier d'un point de vue moléculaire les cellules normales et les cellules cancéreuses, ce qui a initié les recherches sur des thérapies spécifiques, basées sur les anticorps monoclonaux par exemple.

Les gènes suppresseurs de tumeur, aussi appelés anti-oncogènes, constituent la deuxième classe (Bertram 2000). Ils codent pour des protéines réprimant la prolifération cellulaire, voire induisant l'apoptose. Les altérations moléculaires observées dans les cellules tumorales sont souvent à l'origine de la perte de fonction de ces gènes. La protéine p53, inhibiteur nucléaire du cycle cellulaire, pro-apoptotique, est l'anti-oncogène le plus connu, 70% des cancers présentant une mutation de ce gène (Goh, Coffill et al. 2011).

Pour finir, la dernière classe est composée des gènes de maintien de l'intégrité génomique, qui induisent généralement une cascade d'événements anti-prolifératifs (Bertram 2000). Ils sont capables de détecter et de réparer les lésions de l'ADN qui ont modifié les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur. Ces systèmes de réparation sont également

inactivés dans les cellules cancéreuses. Ils sont souvent mutés dans les premières phases de la tumorigénèse, facilitant l'accumulation des mutations suivantes.

La formation d'un cancer au sens strict comporte 2 étapes distinctes et nécessairement successives : la cancérogenèse suivie de la tumorigénèse (Bertram 2000; Hanahan and Weinberg 2000).

1.4.2. *Cancérogenèse*

Ce stade de la transformation cancéreuse nécessite deux étapes : l'initiation et la promotion. Ces deux étapes sont obligatoirement successives et l'initiation précède toujours la promotion, sans quoi le processus cancéreux s'arrête. L'initiation correspond à l'accumulation des anomalies génétiques, la promotion à la détection par la cellule de facteurs de prolifération qui vont entraîner les divisions. Ces signaux vont donc pérenniser les anomalies au cours des divisions, et ainsi assurer la descendance de la cellule anormale, qui va de surcroît accumuler de nouvelles anomalies génétiques.

L'initiation est directement liée à l'action des carcinogènes qui mutent des gènes importants dans le maintien de l'intégrité et des caractéristiques de chaque type cellulaire. Il en résulte des pertes ou gains de fonctions cellulaires : activation ou dérégulation d'un oncogène, inhibition ou répression d'un gène suppresseur de tumeur.

La promotion est caractérisée par une grande instabilité génomique et une augmentation de la perte d'homéostasie. Cette instabilité génomique est due à des mutations de deux types de gènes. Les « gate keeper genes » qui assurent le contrôle du passage à une étape ultérieure du cycle cellulaire, ce sont des "points de contrôle" du cycle cellulaire (van Heemst, den Reijer et al. 2007). Une perte de fonction de ces gènes permet à la cellule cancéreuse de passer rapidement à la phase ultérieure du cycle cellulaire, donc *in fine* de proliférer de façon incontrôlée. Les « caretaker genes » qui assurent physiologiquement la réparation des anomalies liées à l'ADN (Levitt and Hickson 2002 ; van Heemst, den Reijer et al. 2007). Leur inactivation entraîne une instabilité accrue et une accumulation d'anomalies génétiques.

Ces points de contrôle et de réparation altérés, la cellule cancéreuse a désormais perdu la capacité à "reconnaître sa vieillesse", initier sa mort et réparer les dommages de son ADN. La réponse aux signaux de croissance physiologiques est en outre disproportionnée, puis la

cellule commence à produire ses propres signaux de prolifération, la croissance incontrôlée d'un pool de cellules n'a alors plus de limite.

1.4.3. Tumorigenèse

Il s'agit du développement du cancer donnant des conséquences cliniques. La néoangiogenèse et la mise en place d'une circulation sanguine stable et relativement efficace sont des préalables indispensables à cette phase car la croissance tumorale est telle qu'elle nécessite des apports importants et dédiés. Dans un premier temps, la tumeur grossit jusqu'à atteindre la lame basale : le cancer est dit *in situ* et son risque de métastase est faible. Puis, la croissance tumorale continue et la membrane basale se rompt, le cancer devient invasif : les cellules cancéreuses ont alors de grandes facilités à atteindre les courants métastatiques (circulations lymphatique pour les carcinomes et veineuse pour les sarcomes) et la dissémination dans le corps débute.

1.4.4. Evolution

L'évolution spontanée d'un cancer quel qu'il soit, où qu'il soit, est de se développer et d'envahir les tissus avoisinants. De son foyer initial, le cancer va (en dehors de tout traitement ou si le traitement n'est pas efficace) se développer de manière locale, régionale puis se propager à distance de la tumeur initiale et former des métastases (Gisselsson 2011; Greaves and Maley 2012). Des cancers évoluent lentement, sur des années, surtout au début ; certains se développent à partir de tumeurs ou de lésions tissulaires bénignes (d'où l'intérêt de les découvrir et de les traiter à temps) ; d'autres ne métastasent jamais ; d'autres encore évoluent malheureusement très vite, les tumeurs se développent rapidement et des métastases se forment en quelques mois. L'évolution dépend du type du cancer et de sa prise en charge.

1.5. Epidémiologie

L'augmentation de l'espérance de vie, le changement du mode de vie (régime alimentaire par exemple) et le développement des techniques de détection des cancers ont fait qu'au XXI^e siècle, le cancer est considéré comme un enjeu majeur de santé publique dans de nombreux pays à travers le monde. On constate en effet une forte augmentation de l'incidence du cancer dans les pays industrialisés. L'étude statistique de Kamangar (Kamangar, Dores et

al. 2006) indique qu'en 2002 on a estimé à près de 11 millions le nombre de nouveaux cas de cancer dans le monde. Entre 1980 et 2000 par exemple, on a observé en France une hausse de plus de 60% du nombre de nouveaux cas de cancers diagnostiqués et près de 150 000 décès chaque année.

En France comme aux USA, le cancer est actuellement la première cause de mortalité prématurée et la seconde cause de décès tous âges confondus (Fig. 4). En France, le cancer est la cause d'environ 33% des décès chez les hommes et 23% chez les femmes. La France se situe au 12e rang pour les hommes, et au 33e rang pour les femmes (Ward, Thun et al. 2006). A l'heure actuelle, les cancers ayant la plus forte incidence, sont les cancers du poumon, de l'estomac et du foie, les cancers colorectaux, et les cancers du sein chez la femme, de la prostate chez l'homme (Kamangar, Dores et al. 2006).

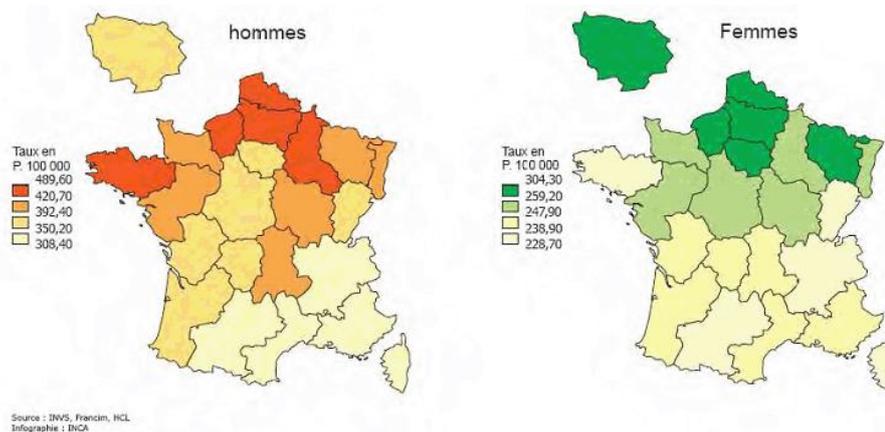


Figure 4 : Taux standardisés d'incidence (par rapport à la population mondiale), tous cancers confondus, à l'échelle régionale en 2005 en France métropolitaine (<http://www.inra.fr>).

1.6. Facteurs de risque

L'origine des altérations qui modifient les oncogènes et les gènes suppresseurs est multiple (Dossus and Kaaks 2008; Wei, Wolin et al. 2010). On les classe généralement en deux grandes catégories, exogène et endogène (Fig. 5).

- L'origine exogène correspond à toutes les expositions environnementales auxquelles un organisme est soumis. Cela va du tabac aux ultraviolets du soleil en passant par l'amiante, les radiations gamma, l'alcool, la pollution, l'alimentation et de nombreuses autres substances auquel un individu est exposé volontairement ou involontairement. Mais, il ne s'agit pas que

de questions d'environnement, puisque cette catégorie recouvre aussi, par exemple, les bactéries et virus. Ces phénomènes exogènes peuvent agir directement au niveau de notre ADN et provoquer des altérations comme certaines molécules dans le tabac ou les ultraviolets ou provoquer des états inflammatoires favorisant l'apparition de cellules cancéreuses comme avec l'alcool.

- Les altérations d'origine endogène sont provoquées en partie par des molécules issues de notre métabolisme comme les espèces réactives à l'oxygène. Chaque jour, notre ADN subit des millions d'agressions de la part de ces molécules mais dans la très grande majorité des cas, celles-ci sont réparées de manière très efficace. Néanmoins, il suffit d'une défaillance dans la réparation d'un gène important pour enclencher ou continuer un processus de transformation cellulaire. Dans certains cas, l'apparition d'un cancer a une composante héréditaire et c'est ainsi que des gènes défectueux peuvent être transmis. On peut en citer un exemple comme le gène BRCA1 (Poynter, Langholz et al. 2010), impliqué dans des cas familiaux de cancer du sein ou de l'ovaire.

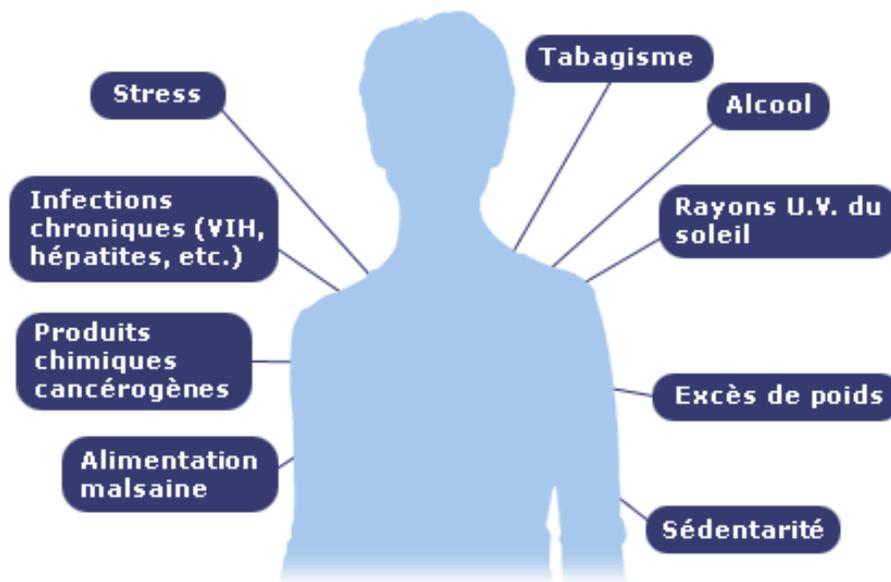


Figure 5 : Les facteurs de risques exogènes du cancer (<http://www.paperblog.fr>).

1.7. Dépistage

Le but du dépistage du cancer est de détecter des cancers asymptomatiques (lésions précancéreuses ou cancers à des stades peu avancés) par l'utilisation de tests susceptibles

d'être proposés à un grand nombre de personnes. La validité d'un dépistage est démontrée par sa capacité à différencier efficacement les personnes probablement saines des personnes probablement atteintes de cancer et pour lesquelles d'autres examens plus approfondis seront nécessaires. Le dépistage doit amener à une réduction de la mortalité chez les patients qui ont été dépistés par rapport aux personnes chez lesquelles le cancer a été trouvé par la symptomatologie classique.

Les dépistages ayant prouvé leur intérêt en diminuant le nombre de décès par cancer sont le frottis du col utérin, pour dépister les lésions précancéreuses et les petits cancers du col utérin et la mammographie, pour dépister des cancers du sein à un stade précoce. En pratique, seuls les cancers du sein, du col utérin, de la peau, du colon et du rectum, de la prostate peuvent actuellement faire l'objet d'un dépistage (Barrett and McKenna 2011 ; Viguier 2011). Les cancers candidats au dépistage doivent être fréquents, entraîner une mortalité et une morbidité importantes, et rester pendant longtemps à un stade pré-clinique (sans symptômes). Une thérapie efficace démontrée doit exister pour ces pathologies. Et pour finir ils doivent pouvoir être découverts par un test ayant une bonne sensibilité, une bonne spécificité, si possible un coût modéré et peu d'inconvénients pour le sujet bien portant pour pouvoir être répété régulièrement.

Chaque technique de dépistage doit être évaluée dans ses effets positifs et négatifs (McPhee 1995). Les bénéfices incluent : un meilleur pronostic pour les malades grâce à une détection précoce ; une diminution de l'importance du traitement en relation avec une moins grande agressivité de la tumeur ; une tranquillité d'esprit pour les sujets ayant un test négatif ; la diminution des coûts généraux du traitement ; une diminution de la mortalité. Les aspects négatifs ne doivent pas être négligés : on s'intéresse, en effet, à une population cliniquement saine, sans aucun symptôme. Ces aspects négatifs incluent l'inconfort des tests de dépistage et les conséquences psychologiques et économiques de faux positifs. Les inconvénients potentiels doivent être minimes par rapport aux avantages réellement constatés. Un test de dépistage doit être simple, facile à accepter par les bien portants (surtout si on doit le répéter assez souvent), n'avoir que peu d'effets secondaires, et si possible être de coût modéré. En outre, il doit être efficace donc fiable et reproductible. Un bon test de dépistage doit être très sensible (ne pas laisser "passer" des cancers, le moins de faux négatifs possible) et spécifique (le moins de faux positifs possible). Cependant, généralement, plus un test est sensible, moins il est spécifique et réciproquement.

1.8. Diagnostic

Selon les signes révélateurs par le dépistage, il faut pratiquer un certain nombre d'examen complémentaires pour poser le plus rapidement possible un diagnostic, avec le moins de pénibilité pour le patient. Pour cela, une biopsie va être réalisée permettant une connaissance histologique précise, le bilan complet de la pathologie cancéreuse (recherche d'évolution à distance) va être fait et pour finir le stade du cancer que l'on va devoir traiter va être défini pour mettre en route un projet thérapeutique.

Les bilans diagnostiques ont pour but de rechercher la meilleure efficacité pour le patient : c'est-à-dire arriver le plus vite possible à prendre la bonne décision thérapeutique. Le retard au diagnostic constitue une perte de chance majeure pour le patient et aboutit à de mauvais résultats thérapeutiques. C'est sur la rapidité et la qualité du premier traitement que se jouent les chances du malade.

Quand un chirurgien ôte une tumeur primitive, il s'intéresse toujours aux ganglions qui drainent l'organe concerné par la tumeur. En effet, si des cellules cancéreuses ont déjà diffusé par voie lymphatique, il en sera retrouvé au niveau de ces ganglions. L'envahissement ganglionnaire signe le stade déjà avancé de la tumeur ainsi que son pouvoir métastatique ; une chimiothérapie s'avérera nécessaire pour s'attaquer aux cellules cancéreuses qui très vraisemblablement se situent quelque part dans l'organisme sans que pour autant ce lieu puisse toujours être identifié.

1.9. Traitements

Le traitement nécessite d'avoir un diagnostic de certitude et de connaître le type du cancer, d'évaluer son extension locale, régionale et la présence ou non de métastases ainsi que l'état général du patient (âge, fonctions cardiaque et rénale, présence d'autres maladies)

Suivant les cas, il repose sur (Goozner 2012):

- L'exérèse (l'ablation) chirurgicale large de la tumeur quand cela est possible, large voulant dire que le bistouri du chirurgien passe uniquement par des tissus sains.
- Une radiothérapie, une irradiation de la tumeur permettant de faire diminuer voire disparaître celle-ci.
- Une chimiothérapie qui correspond à la prescription de médicaments s'attaquant au cancer et à ses métastases.

Certains cancers possédant des caractéristiques particulières peuvent bénéficier également d'un traitement hormonal, d'un traitement à visée immunologique consistant à augmenter l'action du système immunitaire ou d'un traitement à base d'ultrasons, une technologie en plein développement s'appuyant sur la focalisation d'un faisceau ultrasonore très puissant sur une métastase. Souvent, plusieurs de ces types de traitements sont nécessaires chez un même patient.

1.10. L'immunosurveillance

La théorie de l'immunosurveillance (ou immunoediting) stipule que tout au long de la vie, des cellules tumorales sont éliminées par le système immunitaire. L'interaction entre immunité et tumeur suivrait trois phases : l'élimination (les tumeurs sont détruites) ; l'équilibre (un équilibre dynamique permet que des cellules tumorales soient gardées sous contrôle sans être détruites) ; l'échappement (les cellules tumorales échappent au contrôle par le système immunitaire) (Quezada, Peggs et al. 2011 ; Schreiber, Old et al. 2011).

De nombreux arguments en faveur de l'immunosurveillance ont été rapportés chez la souris et chez l'homme, qu'il s'agisse de l'implication globale du système immunitaire dans l'élimination des cellules tumorales à un stade précoce ou dans un ralentissement de son évolution vers des stades plus avancés, ou qu'il s'agisse de l'identification et du rôle des molécules ou cellules impliquées.

Grâce aux modèles murins, plusieurs types cellulaires ont été impliqués dans l'immunosurveillance des cancers. Ainsi, les lymphocytes T, les cellules Natural Killer (NK) et les cellules NKT se sont avérées être des effecteurs directs de l'immunosurveillance (Ikeda, Chamoto et al. 2004), et il est vraisemblable que leurs différentes actions sont dépendantes de l'origine cellulaire de la tumeur. Les études *in vivo* de modèles murins ont aussi permis de démontrer l'importance de certaines molécules dans la protection de l'hôte comme celle de l'interféron γ (IFN γ) par plusieurs mécanismes directs ou indirects (Ikeda, Old et al. 2002).

L'immunoediting des cancers ne permet pas une protection totale des individus, même immunocompétents, et lorsque des cellules tumorales ont échappé à l'immunosurveillance et qu'elles deviennent des cellules malignes proliférantes, on observe le développement d'une tumeur cancéreuse.

2. Le cancer du sein

Le sein est une glande qui produit le lait pour nourrir le nouveau-né. Il joue un rôle important dans la féminité et dans l'image que la femme a de son corps. Chaque sein est composé d'une vingtaine de compartiments, séparés par du tissu graisseux, contenant les lobules qui produisent le lait en période d'allaitement. Des canaux transportent le lait vers le mamelon. Les hormones sexuelles de la femme, œstrogènes et progestérone, ont une grande influence sur les glandes mammaires.

2.1. Sein normal

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme. Le sein est constitué de deux compartiments : la partie glandulaire et la partie tissulaire (stroma et tissu conjonctif). La partie glandulaire de la glande mammaire contient 15 à 20 lobes lesquels sont constitués de nombreux petits lobules, tous liés par des canaux, se terminant par une douzaine de bulbes ténus qui produisent le lait (Fig. 6). Les canaux et les lobules sont formés par des cellules épithéliales encerclées par une couche de cellules myoépithéliales attachées à la membrane basale permettant le maintien de la structure tubulaire des canaux et des lobules. Les tissus conjonctif et graisseux sont composés de fibroblastes dans la matrice extra cellulaire et d'adipocytes. Une coopération permanente existe entre ces deux compartiments au cours du développement de la glande mammaire. Cette architecture se construit tout au long de la vie, du stade foetal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles, œstrogènes et progestérone, et d'un certain nombre de facteurs de croissance.

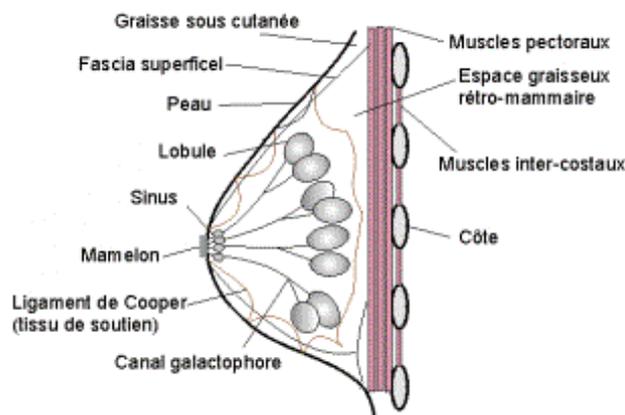


Figure 6 : Coupe d'un sein

2.2. Déclenchement tumoral

La glande mammaire est un organe en évolution permanente sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance. Ceci en fait un organe à part du point de vue du nombre de cellules en croissance et en différenciation, mais le rend plus susceptible aux transformations cancéreuses (Olsson 2000). Comme tout mécanisme tumoral, la carcinogenèse mammaire résulte de l'acquisition par les cellules d'un certain nombre de caractéristiques acquises par les cellules tout au long du développement tumoral (voir chapitre précédent).

Après l'étape d'initiation, les cellules entrent dans la seconde étape dite de promotion, où elles acquièrent leur indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance grâce aux proto-oncogènes, et perdent leur capacité de communication intercellulaire. Cette acquisition d'indépendance peut se faire de plusieurs manières, avec notamment des pertes de fonctionnalité des anti-oncogènes, comme la protéine du rétinoblastome (pRb) qui peut bloquer le cycle cellulaire ou contrôler sa progression, et le produit du gène p53 qui contrôle lui aussi l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages causés à l'ADN, ou encore une surexpression de récepteurs transducteurs de signaux comme par exemple le récepteur HER2 (Neve, Lane et al. 2001).

Dans le cas des cancers du sein hormonaux dépendants, la régulation de la croissance tumorale par les oestrogènes se fait de la même manière que pour le développement normal du sein. Les oestrogènes pénètrent par voie passive dans la cellule et se fixent à leur récepteur cellulaire (cytoplasmique ou nucléaire). Il s'en suit une modification de la conformation du récepteur avec dimérisation. Le dimère se fixe alors à l'ADN sur une séquence spécifique ERE (« estrogen-responsive element »). Cette séquence spécifique se situe au niveau de la région promotrice des gènes régulés par l'oestrogène (Murphy and Watson 2002). Ceci entraîne soit une induction du cycle cellulaire ce qui correspond donc à un contrôle direct, soit la production d'enzymes et de peptides nécessaires à la synthèse d'acides nucléiques (comme c-myc) ce qui correspond alors à un contrôle indirect.

Dans certains cas (5 à 10% des cancers du sein), tous ces mécanismes sont favorisés par la présence des mutations oncogéniques héréditaires qui touchent préférentiellement les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes tels que : BRCA1 (pour BReast CAncer 1) sur le chromosome 17 (pour les familles où l'on observe des cancers du sein et des cancers de l'ovaire), BRCA2 sur le chromosome 13 (pour les familles où l'on observe des cancers du sein dans les deux sexes) ou p53. On parle alors de cancers du sein héréditaires par opposition aux

cancers du sein sporadiques. Le gène BRCA1 muté est retrouvé dans 40 à 45% des cas de cancers du sein héréditaires, et une telle mutation n'est quasiment jamais observée dans les cas de cancers sporadiques (Rosen, Fan et al. 2003). Un grand nombre de fonctions sont attribuées au gène BRCA1, notamment dans le maintien l'intégrité du génome, le contrôle du cycle cellulaire, et de l'apoptose. Le gène BRCA1 est donc un maillon essentiel dans le maintien de l'activité normale d'une cellule, c'est pourquoi les personnes qui possèdent une mutation héréditaire de ce gène présentent 50 à 80% de risque de développer un cancer du sein par la perte de l'allèle non muté du gène.

2.3. Evolution

Le carcinome in situ est la phase la plus précoce du cancer du sein. Ce stade représente 15 à 20 % des cancers du sein dépistés. La maladie localisée est encore au stade précoce et les cellules cancéreuses sont limitées au sein et les ganglions axillaires ne sont pas atteints. Dans le cas d'un cancer du sein localement avancé, les cellules cancéreuses se détachent de la tumeur d'origine et se propagent par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Elles s'accumulent alors dans les ganglions lymphatiques voisins (notamment les ganglions axillaires). Dans le cas extrême où la maladie est métastatique, les cellules cancéreuses ont envahi le sein, ont pénétré dans les vaisseaux lymphatiques ou vasculaires de voisinage et se propagent par la circulation vasculaire et/ou lymphatique à distance du sein. Elles ont pu, dès lors, se fixer dans les organes comme les poumons, le foie, le cerveau ou les os (les plus fréquemment atteints) et y former une autre tumeur que l'on appelle métastase.

2.4. Les différents types de cancer du sein

Le cancer du sein n'étant pas une maladie homogène, il en existe différents types qui dépendent de l'origine des cellules cancéreuses (histologique et cellulaire) et de l'évolution de la maladie. La plupart des tumeurs du sein étant d'origine épithéliale, la majorité des tumeurs malignes du sein sont des carcinomes. Les sarcomes, tumeurs malignes provenant du tissu conjonctif, sont au contraire rarement observés dans le sein.

Le terme cancer du sein comprend différents types de tumeurs classées en deux classes principales en fonction de leur origine et de leurs caractéristiques histologiques (Rakha and Ellis 2011). Les carcinomes in situ sont des tumeurs localisées soit dans les canaux (carcinome canalaire in situ) soit dans les lobules (carcinome lobulaire in situ), sans invasion

du stroma par la membrane basale. Au contraire, dans les carcinomes invasifs la membrane basale est partiellement ou entièrement détruite et les cellules cancéreuses envahissent progressivement les tissus environnants, ce qui peut mener à l'apparition de cellules métastatiques. Le groupe des carcinomes invasifs comprend plus de 10 types différents. Le carcinome canalaire invasif (65 à 80 % des cancers du sein) et le carcinome invasif lobulaire (5 à 15 % des cas) constituent les deux principaux types de cancer du sein.

Mais la classification des cancers du sein peut être réalisée selon des caractéristiques moléculaires (Cummings, Chambers et al. 2011; Rakha and Ellis 2011). Il a été identifié différents sous-types moléculaires de cancer du sein. Les tumeurs sont classées dans des catégories différentes par l'expression des gènes liés au récepteur à l'œstrogène (ER). Les maladies ER-positives et ER-négatives sont biologiquement différentes. Le sous-type ER-positif inclus le luminal A (HER2-) et B (HER2+). Le sous-type ER-négatif inclus le type HER2+/ER- caractérisé par l'expression d'un groupe de gènes liés à HER2 et le type basal caractérisé par une faible expression des gènes liés à HER2 mais par une forte expression des gènes caractéristiques des tissus épithéliaux sains du sein. La classification des tumeurs cancéreuses du sein dans le type basal ou luminal vient de la comparaison de leur profil d'expression génétique à celui de cellules épithéliales saines du sein.

Il existe une dernière forme de cancer du sein, une forme très agressive appelée « triple négatif » ou *basal-like* (Oakman, Moretti et al. 2011). Les cancers mammaires triple-négatifs sont ainsi nommés car les cellules qui les composent ne surexpriment ni le récepteur aux œstrogènes, ni le récepteur à la progestérone, ni le biomarqueur HER2 (Oakman, Moretti et al. 2011). Or ces trois protéines sont les cibles des traitements antitumoraux les plus efficaces actuellement disponibles. C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes de scientifiques recherchent d'autres biomarqueurs surexprimés par ces cellules cancéreuses qui pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

En plus des carcinomes invasifs et in situ, la maladie de Paget du mamelon constitue une forme particulière de tumeur épithéliale maligne dans laquelle les cellules cancéreuses infiltrant l'épiderme. Ces tumeurs ont l'architecture d'un fibroadénome dont le contingent conjonctif prolifère. On en distingue 3 catégories : bénigne, de malignité intermédiaire et maligne, différenciées selon la limitation de la tumeur, la quantité de structures épithéliales, le nombre de mitoses et la présence d'atypies nucléaires.

Enfin il ne faut pas oublier que certaines tumeurs sont bénignes, de nombreux types ont été décrits et parmi eux l'hyperplasie épithéliale atypique qui est considérée comme une forme précancéreuse.

2.5. Epidémiologie

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez la femme. Dans le monde, plus de 1 050 000 nouveaux cas de cancer du sein surviennent chaque année, dont plus de 580 000 dans les pays développés (Europe de l'ouest, Amérique du nord) où il est plus fréquent qu'en Afrique ou en Asie (DeSantis, Siegel et al. 2011). Il est responsable, chaque année, de plus de 400 000 décès de femmes. En France, il représente plus d'un nouveau cas de cancer sur 3 sur l'ensemble des nouveaux cancers chez la femme (Launoy 2010). On estime qu'en 2005, près de 50 000 nouveaux cas y ont été diagnostiqués et 11 637 décès ont été liés à ce cancer. Entre 1980 et 2000, le nombre de nouveaux cas a presque doublé et dans le même temps la mortalité n'a que très peu augmenté grâce à l'amélioration des traitements thérapeutiques. L'âge moyen d'apparition du cancer est environ de 60 ans. Plus de 50 % des cancers sont observés après 65 ans, près de 10 % avant 35 ans. L'incidence croît régulièrement de 30 à 70 ans. Il existe cependant des cancers survenant plus jeune avec environ 15 à 20 % des cancers diagnostiqués avant 50 ans.

Il faut noter que le cancer du sein peut survenir aussi chez l'homme, mais il est rare et environ 200 fois moins fréquent que chez la femme (Johansen Taber, Morisy et al. 2010; Reis, Dias et al. 2011).

2.6. Facteurs de risques

En dépit de la multitude des enquêtes entreprises pour tenter de découvrir des facteurs de risque susceptibles de jouer un rôle dans la genèse de cette pathologie, les causes du cancer du sein ne sont actuellement pas connues et de nombreux points restent à éclaircir. Néanmoins, les études ont mis en évidence certains facteurs (Dean 2008).

- L'âge : L'incidence augmente régulièrement à partir de 30 ans et ce cancer apparaît surtout après 50 ans.

- Facteurs hormonaux : Il est actuellement bien établi que l'âge des premières règles, de la ménopause, la parité et l'âge à la première grossesse ont une influence sur l'apparition d'un cancer du sein. Le nombre de grossesses est important mais le facteur majeur est l'âge à la première grossesse. Ainsi une femme ayant mené une grossesse à terme avant 19 ans voit son risque diminuer de 50 % par rapport à une nullipare. Cependant, pour l'instant, le rôle de ces

modifications hormonales et, en particulier, oestrogéniques reste mystérieux. En particulier, on ignore encore si celles-ci ont un rôle étiologique propre au cancer du sein ou simplement une action promotrice.

- Facteurs familiaux et génétiques : Il est maintenant couramment admis qu'un antécédent de cancer du sein dans une famille augmente le risque de chaque apparenté de développer un cancer du sein au cours de sa vie. La connaissance de ces anomalies génétiques (telles les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2, évoquées plus haut) pourrait permettre, dans l'avenir, un dépistage précoce des tumeurs chez les patientes qui en seraient porteuses. Cependant, il ne faut pas considérer les formes familiales de cancer du sein comme de plus mauvais pronostic que les cas isolés.

- L'alimentation pourrait aussi être en cause : Une alimentation riche en graisses favoriserait l'apparition d'un cancer du sein. La consommation d'alcool est une des plus fortes associations montrées avec le cancer du sein. Une méta-analyse de 4 études de cohortes a montré une forte corrélation entre le risque de cancer du sein et la consommation quotidienne d'alcool.

- La pilule : Pour les contraceptifs oraux, la somme des études faites aux États-Unis, avec des produits différents de ceux utilisés en France, conclut à une augmentation minime du risque (+ 14 %). Le risque serait un peu plus élevé (+ 20 %) pour les femmes ayant pris des contraceptifs oraux pendant plus de 5 ans avant une première grossesse

- Les antécédents : Les femmes qui ont déjà présenté un cancer du sein ont plus de risques que les autres de développer un autre cancer du sein dans leur vie (risque de deuxième cancer de 10 %). Elles seront en général suivies attentivement.

Même si la présence d'un ou de plusieurs de tous ces facteurs favorise le développement d'un cancer du sein, il faut savoir que, mis à part les facteurs familiaux ou génétiques, les autres facteurs augmentent généralement assez peu le risque. Les facteurs de risque ne permettent donc pas de déterminer les causes exactes à l'origine d'un cancer du sein chez une femme.

2.7. Traitements

Le traitement du cancer du sein a deux buts : d'une part contrôler la tumeur primitive et les territoires ganglionnaires, c'est le traitement loco-régional, d'autre part traiter une éventuelle dissémination, c'est le traitement adjuvant.

2.7.1. Chirurgie

Les choix des techniques dépendent des caractéristiques de la tumeur (Howard and Bland 2012). La chirurgie est de plus en plus performante et de moins en moins mutilante. La tumorectomie, chirurgie conservatrice, permet d'enlever une tumeur d'une taille habituellement inférieure à 3 cm et de conserver le sein (Dean 2008). La mastectomie retire le sein avec la tumeur, pour des tumeurs plus volumineuses ou s'il existe plusieurs tumeurs dans le sein. L'ablation d'une partie de la chaîne ganglionnaire située dans l'aisselle près du sein atteint n'est plus réalisée systématiquement.

2.7.2. Radiothérapie

Depuis près d'un siècle, la radiothérapie fait partie de l'arsenal thérapeutique des maladies cancéreuses. Après quelques balbutiements, la technique est aujourd'hui bien maîtrisée et constitue, avec la chirurgie, le traitement le plus répandu des cancers, aboutissant à un grand nombre de guérisons (Dean 2008). Le principe de la radiothérapie est des plus simples : il s'agit d'exposer les cellules cancéreuses à une ionisation, c'est à dire une émission de radiations qui va altérer la composition de l'information génétique des cellules cancéreuses. De nos jours, les spécialistes ont à leur disposition un éventail très large de qualité et de quantité de radiations ionisantes (Howard and Bland 2012). Le matériel génétique contenu sous la forme d'ADN subit des transformations, qui rendront la cellule incapable de se reproduire. Cette "stérilisation" réduit ainsi la reproduction anarchique de ces cellules malignes, responsables du cancer. Les cellules normales peuvent également être affectées par ces radiations, mais leur taux de réparation est supérieur à celles des cellules cancéreuses. Cet "effet différentiel" explique le bénéfice de la radiothérapie.

2.7.3. Chimiothérapie

La chirurgie et la radiothérapie sont des traitements particulièrement efficaces lorsqu'un cancer est limité à une seule région de l'organisme (Dean 2008). Mais lorsque les cellules cancéreuses se sont dispersées, l'usage de la chimiothérapie devient indispensable. Contrairement à la chirurgie ou la radiothérapie, la chimiothérapie est un traitement général et non local qui doit s'intégrer dans une approche globale de la maladie.

La chimiothérapie a pour objectif d'enrayer ou de ralentir l'évolution de la prolifération des cellules cancéreuses, en les détruisant et en empêchant leur reproduction anarchique au sein de l'organisme. En fonction des substances utilisées, on trouve différents modes d'action : certains médicaments empêchent la division cellulaire et d'autres bloquent le cycle de croissance des cellules. Bien que les médicaments s'attaquent en particulier aux cellules cancéreuses, leur action toxique peut également toucher dans une bien moindre mesure les cellules saines.

2.7.4. Hormonothérapie

Dans les cancers du sein, la multiplication de certains types de cellules malignes peut être dépendante des hormones. L'hormonothérapie consiste alors à bloquer l'action des hormones de l'organisme pour éviter qu'elles stimulent le cancer (Martinez Guisado, Sanchez Munoz et al. 2011). Dans le cadre du cancer du sein, on bloque l'action des œstrogènes, soit en bloquant l'action des hormones au niveau des tumeurs, c'est le cas avec le tamoxifène, soit en bloquant la sécrétion d'hormones par les ovaires. Dans ce cas, on peut procéder à une radiothérapie des ovaires, ou à une chirurgie retirant les ovaires (ovariectomie). On peut également procéder au blocage de la sécrétion par l'injection de médicaments par voie sous-cutanée. L'hormonothérapie dans le cancer du sein est indiquée lorsque les cellules cancéreuses contiennent les récepteurs aux hormones.

2.7.5. Immunothérapie, la belle histoire de l'Herceptin

L'immunothérapie stimule les défenses normales de l'organisme afin que celui-ci lutte contre la tumeur maligne et la détruise. C'est ce qu'on appelle les réactions immunitaires. Les tumeurs malignes sont peu immunogènes, c'est à dire qu'elles ne sont généralement pas reconnues comme étrangères par l'organisme qui va les tolérer et les laisser proliférer.

Il faut donc stimuler les mécanismes de défense de l'organisme avec différents procédés. Vingt à 25 % des cancers du sein sont particulièrement agressifs et ont plus de risque de se disséminer dans l'organisme. Ces cellules tumorales particulières possèdent à leur surface un nombre très important de récepteurs spécifiques à activité tyrosine kinase baptisés HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*). A la fin des années 1990, un traitement capable d'agir spécifiquement sur ce récepteur a été développé : le trastuzumab (Herceptin) (McNeil 1998). L'Herceptin est un anticorps monoclonal murin humanisé capable de se fixer sur les récepteurs HER2 ce qui va freiner la croissance tumorale. L' Herceptin appartient ainsi à une classe de médicaments appelés "anticorps monoclonaux" (Dillman 2011). L'Herceptin a été approuvé par la FDA en 1998. Testé sur des cancers très avancés, l'ajout de l'Herceptin® à la chimiothérapie a permis à des patientes incurables de gagner plusieurs mois de vie. Mais c'est en 2005 que l'Herceptin a réellement bouleversé la cancérologie. Cette année-là, plusieurs grandes études ont montré que l'administration d'Herceptin après une chimiothérapie standard pour des cancers du sein HER2⁺ soignés à des stades précoces diminue de moitié les risques de récurrence. On ne parle plus alors de mois de vie gagnés, mais de 50 % de guérison en plus. Le modèle de l'Herceptin a fait exploser la recherche et les espoirs mis dans l'immunothérapie. Plusieurs autres thérapies ciblées sont actuellement en cours d'évaluation dans le cancer du sein et la recherche avance à grand pas.

3. Diagnostic du cancer du sein

Il est classique de considérer le cancer du sein comme une maladie générale et ce dès le diagnostic. Ceci est dû à la fréquence et à la précocité de la dissémination métastatique. On estime que la moitié des patientes est porteuse de métastases occultes au moment où le diagnostic est établi. On conçoit donc l'importance du gain de temps obtenu par le dépistage précoce des tumeurs du sein. Dépistage régulier et diagnostic précoce sont donc les deux clés de la guérison.

3.1. Dépistage

On entend par dépistage l'identification, par un test de réalisation facile et peu coûteuse, de sujets atteints d'une affection donnée et qui sont apparemment en bonne santé (Harmer 2011). Le dépistage n'a pas pour but de poser un diagnostic. Il se différencie en cela du

diagnostic précoce. Les sujets qui présentent un test de dépistage positif doivent subir des examens à visée diagnostique.

Le dépistage se résume à deux méthodes cliniques, l'auto-examen des seins et l'examen médical, et à un seul moyen paraclinique, la mammographie.

- Auto-examen des seins : Cette méthode consiste à apprendre aux femmes l'auto-inspection et l'auto-palpation des seins et ce de manière mensuelle. Cette méthode est simple, peu coûteuse et atraumatique.

- Examen médical : Son efficacité sur la réduction de la mortalité par cancer du sein est de l'ordre de 25 %. Cet examen peut s'intégrer dans le cadre d'une visite médicale annuelle.

- La mammographie : La mammographie est le meilleur examen pour détecter tôt un cancer du sein, avant même que les symptômes n'apparaissent. En effet, cet examen permet de détecter la présence d'une masse anormale bien avant qu'une douleur ne soit ressentie et même si l'examen clinique est normal (Evans and Whelehan 2011 ; Hirsch and Lyman 2011). En particulier, la mammographie peut détecter des zones de micro-dépôts de calcium dans le sein appelés micro-calcifications, qui même s'ils sont souvent bénins, peuvent parfois révéler un cancer. L'European Group for Breast Cancer Screening, qui rassemble la plupart des équipes européennes qui travaillent sur le dépistage du cancer du sein, a montré que la mortalité par cancer du sein peut être réduite jusqu'à 40 % grâce à un dépistage mammographique parmi les femmes âgées de plus de 50 ans. Néanmoins, cette modalité d'imagerie présente plusieurs limitations (Gemignani 2011; Hirsch and Lyman 2011), incluant jusqu'à 20 % de faux négatifs (un faux négatif correspond à une détection manquée d'un vrai cancer), jusqu'à 12 % de faux positifs (un faux positif ou fausse détection se traduit par le rappel d'une femme pour des examens complémentaires), une détection difficile des cancers chez les femmes ayant des seins avec tissus denses. La mammographie détecte environ 90 % des tumeurs chez les femmes de plus de 50 ans, mais seulement 60 % chez les femmes de moins de 50 ans. Et pour finir un manque de spécificité lorsque la mammographie ne permet pas de différencier les lésions bénignes des lésions cancéreuses.

3.2. Le trépied du diagnostic

Si une anomalie est découverte au cours du dépistage, le médecin prescrit des examens complémentaires afin de confirmer ou d'éliminer le diagnostic de cancer. Le diagnostic du cancer du sein repose sur un trépied clinique - radiologique - histologique. La dimension clinique du diagnostic du cancer du sein dépend des circonstances de la découverte (dépistage de masse, dépistages spontanés, auto-examen). La dimension radiologique est basée sur la réalisation d'une mammographie par un appareil ayant subi les contrôles de qualité nécessaires. Une échographie viendra conforter cet examen dans certaines circonstances. La dimension histologique repose sur le diagnostic du type de cancer et le caractère invasif ou non-invasif de la lésion et qu'on associera à la connaissance de critères pronostics comme le grade histologique et les récepteurs hormonaux.

3.2.1. Examen clinique

Dans près de 90 % des cas, c'est la patiente elle-même qui consulte pour l'apparition d'un nodule mammaire découvert de façon fortuite. Lors de la palpation, la suspicion se fait à partir de la découverte d'un nodule, que l'on peut détecter par palpation à partir de 1 cm de diamètre environ. Cependant, seul le médecin pourra juger des examens complémentaires nécessaires, car tous ces signes ne se rencontrent pas seulement dans le cas des cancers. Dans un premier temps, le médecin interroge la patiente sur ses antécédents médicaux, chirurgicaux et gynéco-obstétricaux, personnels et familiaux. Après l'entretien, le médecin réalise un examen physique approfondi et complet des seins.

3.2.2. Examen radiologique

A la suite des examens cliniques, les examens radiologiques vont permettre d'obtenir des images d'une partie du corps ou des organes à l'aide de différents appareils. On les appelle aussi examens d'imagerie.

- Mammographie :

Une mammographie est un examen radiologique réalisé à l'aide d'un appareil spécialement conçu, le sénographe comportant une source de rayons X adaptée à la radiologie

des tissus mous et un système de compression du sein. Elle permet de déceler de petites bosses cancéreuses ou des modifications précancéreuses dans le sein (Fig. 7).

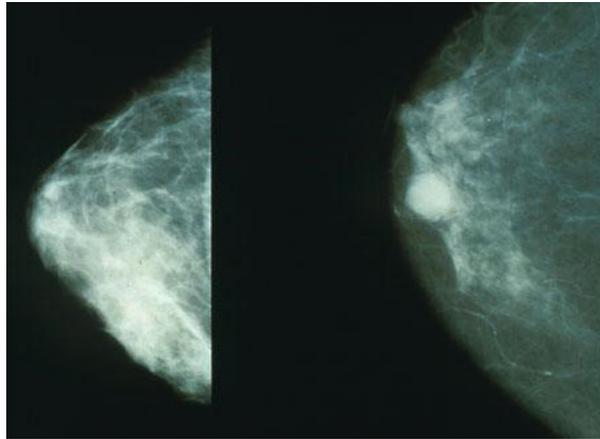


Figure 7 : Photographies de mammographie. Mammographie d'un sein normal à gauche et d'un sein présentant une tumeur à droite.

La mammographie analogique conventionnelle à film a été reconnue comme la méthode la plus efficace pour la détection précoce du cancer du sein. Néanmoins, la mammographie analogique détecte plus difficilement les cancers chez les femmes de moins de 50 ans et chez les femmes aux seins denses. La mammographie numérique plein champ (Full-Field Digital Mammography ou FFDM) a été introduite pour dépasser les limites de la mammographie analogique (Skaane 2009). Plusieurs études scientifiques ont montré que la précision de la mammographie numérique est significativement meilleure que celle de la mammographie analogique dans le cas des seins denses rencontrés en particulier chez les femmes de moins de 50 ans. Tous stades confondus, on peut estimer que le diagnostic mammographique isolé est exact dans 85 à 90 % des cas.

La seule mammographie ne peut confirmer la présence d'un cancer du sein. Pour ce faire, une biopsie - prélèvement d'un petit fragment de tissu pour fins d'analyse sous le microscope - doit être pratiquée.

- Echographie :

L'échographie est un examen complémentaire souvent indispensable qui complète les renseignements fournis par la mammographie (Teboul 2010). Elle peut aider à localiser l'anomalie pour faciliter un prélèvement (ponction échoguidée) ou reconnaître s'il s'agit d'un kyste liquidien, mais elle ne peut jamais remplacer la mammographie.

- Il existe également plusieurs autres techniques d'imageries moins utilisées ou encore en phase d'évaluation comme l'échotomographie doppler à codage couleur, l'IRM (Monticciolo 2011), la galactographie ou l'élastographie (Garra 2011 ; Moadel 2011; Yang 2011). Cette nouvelle technique d'imagerie de l'élasticité est en cours d'analyse. Le principe est simple. On envoie une onde sonore (dans des fréquences non audibles) en direction de l'anomalie mammaire. En fonction de l'élasticité du tissu, elle va se déformer, avant de renvoyer l'onde acoustique. Comme des balles en mousse de différentes densités, les tumeurs ainsi bombardées retrouvent leur forme originale à des vitesses différentes. Les tumeurs cancéreuses plus dures ne se déforment pas ou peu, et l'écho revient plus vite. A l'inverse, les tumeurs bénignes plus élastiques encaissent le choc en se déformant et l'écho revient plus tardivement. Cette élasticité peut être mesurée grâce à l'écho des ultrasons. Il n'y a pas d'aiguille. Le patient ne note aucune différence par rapport à une échographie classique. Réduisant la peur et l'anxiété des femmes, cette méthode pourrait se révéler très rentable, par la réduction du nombre de biopsie effectuée.

3.2.3. Examen histologique

La mammographie permet d'identifier les lésions du sein, mais ne permet pas de dire s'il s'agit de tumeurs bénignes ou cancéreuses. Actuellement, seul un prélèvement par ponction cytologique (prélèvement de cellules ou de liquide) ou par biopsie (prélèvement de tissus) permet de confirmer le diagnostic. Ce prélèvement va alors permettre de réaliser un examen au microscope : un examen anatomopathologique. Cet examen donne des informations précises sur le type de cancer du sein et ses caractéristiques. On distingue deux types d'examen au microscope : la cytologie (examen cytopathologique) et l'histologie (examen histopathologique). Seul l'examen histopathologique élimine ou affirme de façon définitive le diagnostic de cancer.

3.3. Pronostic

Le pronostic consiste à estimer l'évolution de la maladie. Il est classique de distinguer des facteurs de pronostic dits "anciens" qui ont fait la preuve de leur influence et d'autres plus récents qui sont encore contestés du fait de résultats contradictoires.

3.3.1. Facteurs pronostiques classiques

- L'envahissement ganglionnaire axillaire : Il reste le facteur essentiel. Le nombre de ganglions métastatiques est déterminant pour le pronostic et l'attitude thérapeutique (Giuliano and Han 2011). La plupart des auteurs admettent l'existence de trois groupes pronostiques : moins de 3 ganglions envahis, de 3 à 10 et plus de 10 ganglions métastatiques.
- Le grade histopronostique : Le plus utilisé est celui de Scarff, Bloom et Richardson. Ce grade prend en compte la formation de structures tubulaires, l'anisocaryose (inégalité de taille des noyaux) et le nombre de mitoses. Le score déterminé par ces facteurs détermine les grade I, II et III d'agressivité croissante (Namer, Ramaioli et al. 1998).
- La taille tumorale histologique : Il s'agit d'un facteur pronostique important, surtout pour les tumeurs sans envahissement ganglionnaire. On oppose, dans ce cas, les tumeurs de moins de 1 cm dont le pronostic est excellent et les tumeurs de plus de 1 cm. Cependant quel que soit le statut ganglionnaire, la survie est corrélée à la taille tumorale.
- Les récepteurs hormonaux : Il en existe 2 types : les récepteurs aux oestrogènes (ER) et à la progestérone (PR). La première étude de la valeur pronostique des récepteurs d'oestrogènes publiée par Knight en 1977 (Hayward, Knight et al. 1997) indiquait une fréquence de récurrence nettement plus importante pour les patientes ER- que pour les malades ER+. Il existe plusieurs méthodes de dosage de ces récepteurs, la référence étant la méthode biochimique par radioligand. Actuellement cette méthode tend à être remplacée par le dosage immunohistochimique. Il est classique de distinguer les tumeurs de bon pronostic ER+ PR+ à celles de mauvais pronostic ER- PR- (Fig. 8). Les récepteurs hormonaux sont, par ailleurs, des témoins de l'hormonosensibilité de la tumeur mammaire et de ses métastases.

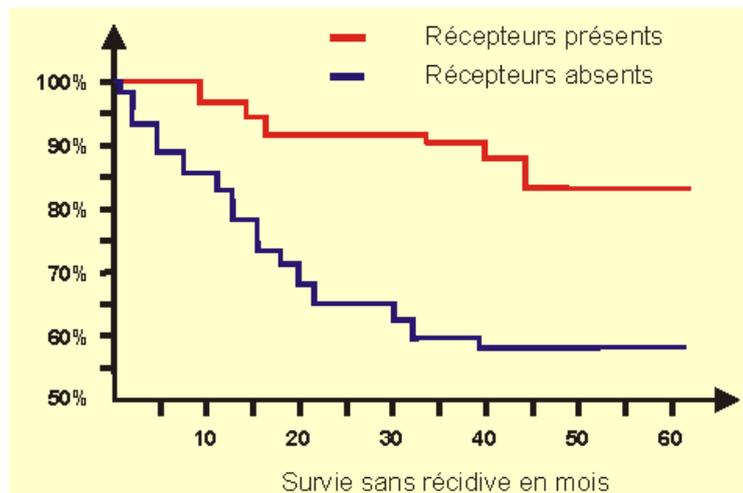


Figure 8 : Rapport entre la présence de récepteurs ER et PR et la survie en cas de cancer du sein métastatique (http://www.oncoprof.net/Generale2000/g10_Hormonotherapie/g10_ht02.php)

3.3.2. Facteurs pronostiques récents

- La prolifération et la ploïdie : Le pourcentage de cellules en phase S est une bonne mesure de la prolifération tumorale. La cytométrie en flux, en mesurant la quantité d'ADN cellulaire (ploïdie), permet de calculer le nombre de cellules en phase S et la durée de la phase S. Les tumeurs aneuploïdes (nombre anormal de chromosomes) sont de moins bon pronostic que les tumeurs diploïdes, mais la mesure de la phase S semble avoir une valeur pronostique supérieure à la ploïdie.

- HER2/neu (c-erb B2) : Le gène *HER2* est un proto-oncogène. L'amplification et la surexpression du produit de ce gène, HER 2, seraient un facteur de mauvais pronostic surtout pour les tumeurs avec envahissement ganglionnaire, mais les résultats des différentes études sont encore contradictoires (Schmidt, Gehrman et al. 2010).

- Cathepsine D : Il s'agit d'un enzyme lysosomal acide qui favoriserait le potentiel métastatique des cellules tumorales. Plusieurs études ont montré une valeur pronostique péjorative lors de la surexpression de cathepsine D mais ces résultats demandent à être confirmés (Nomura and Katunuma 2005).

3.4. La classification TNM

La classification TNM est un système international, proposé par le chirurgien français Pierre Denoix de l'Institut Gustave-Roussy entre 1943 et 1952, de façon à classer les cancers selon leur extension anatomique. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour *node*) et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est affectée d'un coefficient. Dans son principe, cette classification considère seulement les données cliniques et ne s'applique qu'à des cancers qui n'ont pas encore été traités. Mais des variantes ont été proposées pour tenir compte d'examen complémentaires simples ou même des résultats d'une exploration chirurgicale, comme pour s'en servir au moment d'une rechute ou en phase terminale afin de guider les soins palliatifs. La lettre T symbolise la tumeur initiale. Elle est cotée de T0 (quand la lésion primitive n'est pas retrouvée) à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette cotation dépend du volume tumoral, représenté par le diamètre maximum de la lésion, et de la fixation aux organes voisins (peau, vaisseaux, nerfs, os, etc.). La lettre N, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins. La lettre M est cotée M0 en l'absence de métastases connues ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple.

Cette classification a été conçue pour donner aux cancérologues de tous les pays un langage commun qui facilite les échanges d'information entre médecins et chercheurs. Elle contribue à codifier les indications de traitement. Selon les localisations tumorales la combinaison des trois repères TNM permet d'établir un stade (de I à IV) plus synthétique.

3.5. Diagnostic de l'état métastatique

L'apparition de métastases correspond biologiquement au franchissement réussi par des cellules tumorales de l'ensemble des étapes successives du processus de dissémination : invasion locale, extravasation, interaction des cellules tumorales circulantes (CTC) avec les éléments figurés du sang, arrêt des CTC et extravasation, dormance des cellules tumorales disséminées (DTC, aussi appelées micrométastases) et prolifération cellulaire finale conduisant à la formation de métastases. La recherche de métastases est fondamentale dans la stratégie du traitement du cancer du sein. Mais malgré les nombreuses études réalisées ou la connaissance approfondie de certaines explorations, il n'existe actuellement aucune stratégie

validée de recherche systématique de métastase dans le cancer du sein. La recherche de métastase se fera uniquement en fonction de l'âge de la patiente, de l'interrogatoire et de l'examen clinique (taille de la tumeur, mobilité de la tumeur, caractère inflammatoire de la tumeur, présence de ganglions suspects). Ce bilan permet de déterminer l'étendue du cancer et de vérifier l'absence de métastase(s). Il comprendra en général au minimum une radiographie de thorax, une échographie abdominale, une scintigraphie des os et une prise de sang pour le dosage d'antigènes sériques tel que le CA15-3 (*cancer antigen* ou *carbohydrate antigen*) ou l'ACE (antigène carcino embryonnaire). La notion de dosage d'antigène sera expliquée précisément dans la suite de l'introduction. Une piste de recherche actuelle consiste à trouver le moyen de détecter les micrométastases alors qu'elles sont encore « dormantes » afin de pouvoir soit les détruire, soit les empêcher de se réveiller en bloquant le signal biologique de leur réveil (Lianidou and Markou 2011 ; Sun, Yang et al. 2011). La détection de CTC sera un point abordé en détails plus loin dans le manuscrit.

Partie II :

Le diagnostic par détection d'antigènes : utilisation d'anticorps

1. L'immunoanalyse

1.1. L'interaction antigène-anticorps

1.1.1. Définition d'un antigène et d'un anticorps

Les techniques immunologiques sont basées sur la formation de complexes antigènes anticorps (Fig. 9). Le premier élément clé des immunodosages est l'anticorps (Ac). Celui-ci fait partie de la classe des immunoglobulines (Ig). Les anticorps constituent un des principaux composants du système immunitaire permettant d'assurer la défense de l'organisme contre l'intrusion de pathogènes. La majorité des anticorps circulants (véhiculés par le sang) sont produits par les plasmocytes correspondant aux lymphocytes B différenciés en réponse à la pénétration dans l'organisme d'une substance exogène. Cette production d'anticorps contre un « agresseur » n'est en fait qu'une partie de la réponse immunitaire (réponse humorale). L'introduction d'une substance immunogène dans l'organisme stimule un grand nombre de lymphocytes, qui produisent un grand nombre d'anticorps reconnaissant différentes zones de cette substance appelées épitopes ou déterminants antigéniques (réponse polyclonale).

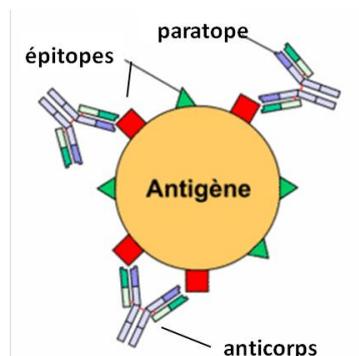


Figure 9 : Interaction entre un antigène et différents anticorps

On définit les antigènes (Ag) comme toute structure capable d'être reconnue par les anticorps (pouvoir antigénique). Ils peuvent être de nature et de caractéristiques extrêmement diverses (protéines, polysides, acides nucléiques, lipides, molécules synthétiques), de masses moléculaires et conformations variées. Certains d'entre eux sont capables de provoquer une réponse immunitaire adaptative, par exemple sous la forme d'une synthèse d'anticorps (pouvoir immunogène), dépendant bien entendu des potentialités immunologiques de l'hôte (van Regenmortel 2000). D'autres antigènes, les haptènes, sont de petites molécules naturelles ou synthétiques (<5000 Da), possédant une réactivité antigénique, mais sans pouvoir immunogène, sauf après couplage à une molécule porteuse (*carrier*).

1.1.2. Structure des anticorps

La purification d'anticorps a permis à Edelman (Edelman 1973) de proposer la première structure d'une immunoglobuline en 1975. La molécule d'anticorps est composée de deux chaînes lourdes identiques, liées entre elles par des ponts disulfures, et de deux chaînes légères identiques, chacune étant liée à une chaîne lourde par des ponts disulfures (Fig. 10). La papaine hydrolyse la molécule en trois parties (Porter 1959) : deux parties identiques Fab (*fragment antigen-binding*) incluant les deux paratopes et une partie Fc (fragment cristallisable, constitué uniquement de chaînes lourdes). La partie de reconnaissance des antigènes est située du côté N-terminal de chaque fragment Fab, alors que la fonction de liaison à des récepteurs est liée à l'extrémité C-terminale. Chaque chaîne lourde et légère possède une partie constante et une partie variable. La partie constante de la chaîne lourde définit la classe des immunoglobulines.

La structure symétrique des anticorps comporte deux sites de liaison pour l'antigène (paratopes), au niveau de la partie variable (bivalence). Les paratopes sont partagés entre les modules VH et VL dont l'association forme une structure en tonneau. Une analyse de séquence des parties variables a permis de définir 3 régions par module où la variabilité de séquence primaire est élevée, appelées boucles hypervariables, ou CDRs (« *complementarity determining region* ») qui permettent la reconnaissance de l'antigène. Cette interaction est de mieux en mieux caractérisée d'un point de vue structural et fonctionnel.

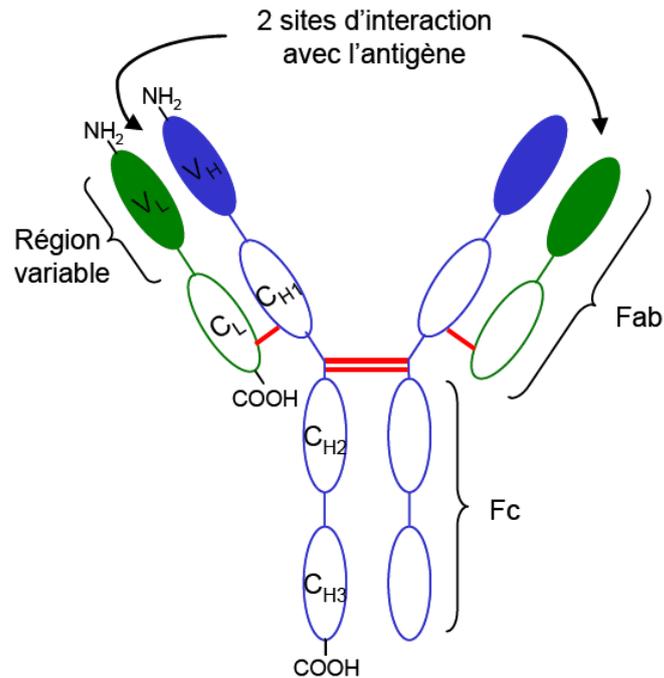


Figure 10 : Structure simplifiée d'une unité de base des immunoglobulines. Les traits rouges symbolisent des ponts disulfures. Fab : « fragment antigène binding » ; Fc : « fragment cristallisable » (D'après la thèse de Laure-Marie NEUBURGER)

Chez les mammifères, on dénombre cinq classes d'immunoglobulines (IgG, IgM, IgA, IgD et IgE) (Tableau 1) avec des types de chaînes lourdes différentes (γ , μ , α , δ et ϵ), et deux types de chaînes légères différentes (κ et λ). Les IgA et les IgM existent respectivement sous forme dimérique et pentamérique, présentant ainsi quatre et dix paratopes spécifiques du même épitope. Les immunoglobulines les plus utilisées pour les immunodosages sont les IgG, qui représentent 75% des immunoglobulines totales du sérum. Les principales caractéristiques des immunoglobulines humaines sont résumées dans le Tableau 1.

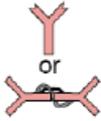
Classe	IgG (4 sous classes)	IgM	IgA (2 sous classes)	IgD	IgE
Chaînes lourdes	γ ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ et γ_4)	μ	α (α_1 et α_2)	δ	ϵ
Chaînes légères	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ
% des Ig du sérum	$\pm 75\%$	$\pm 10\%$	$\pm 15\%$	$\pm 1\%$	$\pm 0.002\%$
kDa	± 150	± 950	± 160 ou 400	± 180	± 190
Liaison aux protéines A de <i>Staphylococcus</i>	+	--	--	--	--
Liaison aux protéines G de <i>Staphylococcus</i>	+	--	--	--	--
Formes					

Tableau 1: Caractéristiques des différentes immunoglobulines humaines (D'après la thèse de Mathieu DUBOIS)

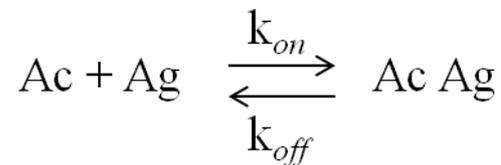
1.1.3. La réaction antigène-anticorps

La réaction antigène anticorps est à la base de tous les immunodosages. Cette réaction peut être décrite schématiquement comme une interaction entre une protéine (ici l'immunoglobuline) et une autre molécule pouvant être de nature protéique ou non. A l'échelle atomique, des interactions de type hydrogène, hydrophobes, de Van der Waals, ou ioniques, entre les acides aminés des anticorps et de l'antigène sont mises en jeu. L'énergie de ces liaisons varie entre 4 et 30 kJ/mol: elle est du même ordre de grandeur que l'énergie d'agitation thermique à 37°C (3.9 kJ/mol). Ceci explique la réversibilité de ces liaisons. Le complexe sera stable si le nombre de liaisons qui interviennent est suffisant.

1.1.4. Notions d'affinité et de spécificité

Les deux caractéristiques essentielles du phénomène de reconnaissance moléculaire sont l'affinité et la spécificité.

L'affinité de l'interaction définit la stabilité du complexe Anticorps-Antigène (Ag-Ac) et peut être caractérisée quantitativement par la constante d'affinité K_a (constante à l'équilibre, en M^{-1}) dont l'écriture découle d'un équilibre réactionnel. A l'échelle macroscopique et de façon simplifiée, ces interactions peuvent être décrites simplement par la loi d'action des masses entre un site de liaison (paratope) et un déterminant antigénique (épitope) :



k_{on} : constante de vitesse d'association, k_{off} : constante de vitesse de dissociation.

Ceci est vrai uniquement en faisant les hypothèses suivantes : (i) la cinétique de la réaction est réversible, de premier ordre vis-à-vis de chacun des réactifs ; (ii) l'antigène est monovalent vis-à-vis de l'anticorps, lui-même pseudomonovalent (raisonnement en site de fixation plutôt qu'en molécule d'anticorps) ; (iii) l'antigène et l'anticorps sont purs et homogènes relativement à leur capacité de fixation ; (iv) il n'existe pas d'effet coopératif entre les réactions possibles (chaque réaction site-à-site étant indépendante).

La constante d'affinité K_a d'un site de liaison pour un site antigénique est définie par les relations :

$$K_a = \frac{[\text{Ac}][\text{Ag}]}{[\text{Ag - Ac}]} \qquad K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

où les crochets désignent les concentrations des espèces.

Cette constante physico-chimique ne dépend que des molécules en présence, du milieu dans lequel a lieu la réaction, et de la température. Cette grandeur reflète l'affinité (la force de l'interaction) de l'anticorps pour son antigène. Cette affinité sera d'autant meilleure que les interactions au niveau moléculaire seront nombreuses et que leur agencement spatial sera le plus approprié pour assurer une parfaite complémentarité entre l'antigène et l'anticorps (modèle de la clé dans la serrure). Les facteurs essentiels qui influencent ces liaisons sont ceux que l'on retrouve de manière générale pour toutes les interactions entre protéines ou entre protéines et ligands. Citons, en particulier, une forte influence du pH, de la concentration ionique, et des solvants qui perturbent les sphères de solvation et déstabilisent les liaisons hydrogènes. Classiquement, le K_a est évalué par la mesure à l'équilibre en utilisant la représentation de Scatchard (Yalow and Berson 1960). Il peut aussi être déterminé à l'aide du biocapteur Biacore permettant de calculer les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} (Fivash, Towler et al. 1998). Plus l'affinité de l'interaction Ag-Ac est grande, plus K_a est élevé et plus le complexe est stable. On considère généralement qu'un anticorps possède une bonne affinité pour un antigène lorsque son K_a est supérieur ou égal à 10^9 M^{-1} . Dans le cas d'une molécule multivalente, il a été observé un effet de coopérativité entre sites qui a donné lieu à la notion d'« avidité ». Les auteurs ont en effet observé que l'affinité d'une molécule multivalente était nettement supérieure à la somme arithmétique des affinités de chacun de ses sites (Dmitriev, Massino et al. 2003).

La spécificité d'un anticorps est une notion beaucoup plus abstraite que l'affinité. Elle correspond à la capacité des anticorps à sélectionner entre des espèces chimiques proches (Janin 1995). Idéalement, un anticorps « spécifique » ne formerait des complexes stables qu'avec le seul antigène contre lequel il a été produit. Toutefois, il existe toujours des « réactions croisées », l'anticorps reconnaissant avec des affinités plus ou moins fortes des antigènes analogues, de structure plus ou moins semblable à celle de l'antigène de référence. Les caractéristiques de spécificité d'un anticorps ne peuvent donc être que relatives au vu de l'ensemble des antigènes possibles. Dans un milieu biologique donné, on considérera que l'anticorps présente une bonne spécificité lorsqu'il permet de mesurer sélectivement l'antigène parmi les molécules présentes dans l'échantillon.

L'affinité et la spécificité de l'interaction Ac-Ag conditionnent fortement les performances des dosages immunologiques.

1.2. Outils actuels de diagnostic immunologique

1.2.1. Origine de l'immunodosage

Les immunodosages regroupent l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction antigène-anticorps. La nature des anticorps et de leur liaison avec les antigènes étant bien caractérisée, cette réaction est devenue un outil performant d'exploration et de quantification. La mise au point du radioimmunodosage est classiquement attribuée à Yalow et Berson qui réalisèrent en 1959 le premier dosage immunologique de l'insuline humaine dans le plasma (Yalow and Berson 1959). La découverte de nouveaux principes de dosages, par compétition et immunométriques (Wide, Bennich et al. 1967; Miles and Hales 1968; Ling and Overby 1972), l'évolution des techniques de séparation des espèces libres ou liées dans le complexe immun (Catt, Niall et al. 1967), et la recherche de moyens originaux de révélation, comme le marquage enzymatique (Engvall and Perlmann 1971), donna à ces méthodes un essor hors du commun. Les progrès de l'immunologie ont permis, dans un premier temps, d'obtenir des anticorps polyclonaux de bonne qualité, dirigés aussi bien contre des petites molécules que contre des molécules de masse moléculaire élevée. Puis, en 1975, les travaux de Köhler et Milstein ont permis d'obtenir des anticorps monoclonaux (MAb), produits par un seul clone de lymphocytes (Kohler and Milstein 1975), dont l'utilisation améliore notablement la spécificité et la sensibilité des techniques. Outre son intérêt scientifique, cette découverte eut de très grandes répercussions technologiques dans l'utilisation industrielle de la spécificité immunologique grâce à la possibilité d'obtention en grande quantité d'anticorps monoclonaux, parfaitement homogène et de spécificité donnée, pouvant être produits à loisir.

Pour pouvoir suivre, à l'échelle macroscopique, ces associations antigène-anticorps, un troisième élément est utilisé : le traceur. Celui-ci résulte de la modification de l'anticorps ou de l'antigène par ajout d'un marqueur. Pendant longtemps, seuls les marqueurs radioactifs ont été utilisés, dont la qualité essentielle est liée à leurs propriétés d'émission non modifiées par l'environnement physicochimique, et à la sensibilité de la détection. Cependant, l'utilisation de la radioactivité présente un inconvénient majeur puisqu'elle est restreinte aux seuls laboratoires agréés pour la manipulation de radioéléments. Des développements méthodologiques importants ont permis de remplacer les éléments radioactifs par des enzymes. Ainsi, des dosages immunoenzymatiques (ELISA) ont été développés par Engvall et Perlmann en 1971 (Engvall and Perlmann 1971). Aujourd'hui, les marqueurs enzymatiques et

les marqueurs luminescents ont pris une réelle importance en pratique courante et ont supplanté les traceurs radioactifs, et d'autres approches sont développées comme les marqueurs fluorescents ou encore l'amplification par PCR (Rolling Circle Amplification).

1.2.2. L'immunodosage par test ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

1.2.2.1. Principe

ELISA est l'acronyme d'un examen de laboratoire appelé en anglais *enzyme-linked immunosorbent assay*, littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée », c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide. Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (*enzyme immunoassays*), dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré suivi par spectrophotométrie, par opposition aux RIA (*radio immunoassays*) dans lesquels l'anticorps est marqué par un radioélément. Parmi les enzymes les plus utilisées, on compte la peroxydase de raifort (HRP pour *horse-radish peroxidase*), la phosphatase alcaline, la glucose oxydase et l'acétylcholinestérase. L'addition d'un substrat de l'enzyme, à la dernière étape du dosage, permet la formation d'un composé soluble et coloré, dont l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre. L'ELISA est une technique biochimique permettant de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La technique utilise un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps) et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, responsable du nom de la technique, peut aussi causer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps (comme pour le test HIV ou le virus du Nil), que pour détecter la présence d'un antigène.

1.2.2.2. Méthode par compétition

Lorsque l'on met en présence un anticorps, son antigène et ce même antigène marqué, il peut se créer deux types de complexe selon que l'anticorps se fixe à l'antigène ou à l'antigène marqué. Le principe de ce dosage réside donc dans la compétition entre les deux formes d'antigène (Fig. 12). Pour rendre cette technique quantitative, la concentration en anticorps et en molécule marquée est maintenue fixe, et l'augmentation de la concentration en

antigène entraîne l'augmentation de la concentration en complexe antigène-anticorps, au détriment de la formation du complexe antigène marqué-anticorps. En établissant une courbe d'étalonnage avec des concentrations connues d'antigène, on détermine la concentration en antigène pour une solution inconnue par comparaison au signal mesuré. L'avantage essentiel du dosage par compétition est de pouvoir s'appliquer à n'importe quel type d'antigène, quelle que soit sa taille. C'est en particulier la seule technique permettant de doser les haptènes ne possédant qu'un seul épitope. Cependant, cette méthode nécessite un nombre de sites anticorps constant et identique entre chaque échantillon pour avoir une bonne précision, puisque c'est l'anticorps limitant qui génère la compétition entre les antigènes. Un deuxième élément limitant pour cette méthode à un seul site de liaison concerne les métabolites et les interférents qui sont susceptibles d'être liés à l'anticorps, et donc de générer un signal qui surestime la quantité d'antigène. Ce manque de spécificité est réduit dans les méthodes immunométriques à deux sites, comme par exemple les méthodes de type sandwich.

1.2.2.3. Méthode du sandwich ou immunométrique

Contrairement aux méthodes par compétition, les méthodes de type sandwich utilisent un excès d'anticorps pour lier l'antigène, puis un second anticorps marqué vient se fixer également sur l'antigène pour révéler la liaison entre le premier anticorps et l'antigène (Fig. 12). Le premier anticorps peut être par exemple fixé à un support solide (par liaison covalente ou par simple adsorption), et la quantité doit être telle que le nombre de sites de liaison soit supérieur au nombre de molécules d'antigènes présentes dans les solutions étalons ou inconnues. L'antigène va ainsi se fixer sur les sites spécifiques. L'anticorps marqué est ajouté, après une première incubation et un lavage, et se fixe sur l'antigène, préalablement fixé au premier anticorps. L'antigène se trouve ainsi pris en sandwich entre les deux anticorps. Un simple lavage permet de séparer les complexes anticorps-antigène anticorps marqués des anticorps marqués libres en excès. Pour que l'anticorps marqué puisse se lier à l'antigène déjà engagé dans une réaction avec le premier anticorps, il est nécessaire que les deux anticorps réagissent contre des épitopes différents de l'antigène. On peut employer, à la fois comme anticorps liants et comme anticorps marqués, des anticorps polyclonaux multivalents, ou utiliser des anticorps monoclonaux spécifiques différents. De même que pour les dosages par compétition, les molécules marquées peuvent l'être par exemple par l'intermédiaire de la radioactivité ou par une enzyme. Dans les différents cas de marquage, le signal correspondant au complexe anticorps-antigène-anticorps marqué est un signal croissant en fonction de la

quantité d'antigène, alors que pour un dosage par compétition, le signal correspondant au complexe est une fonction décroissante de la quantité d'antigène.

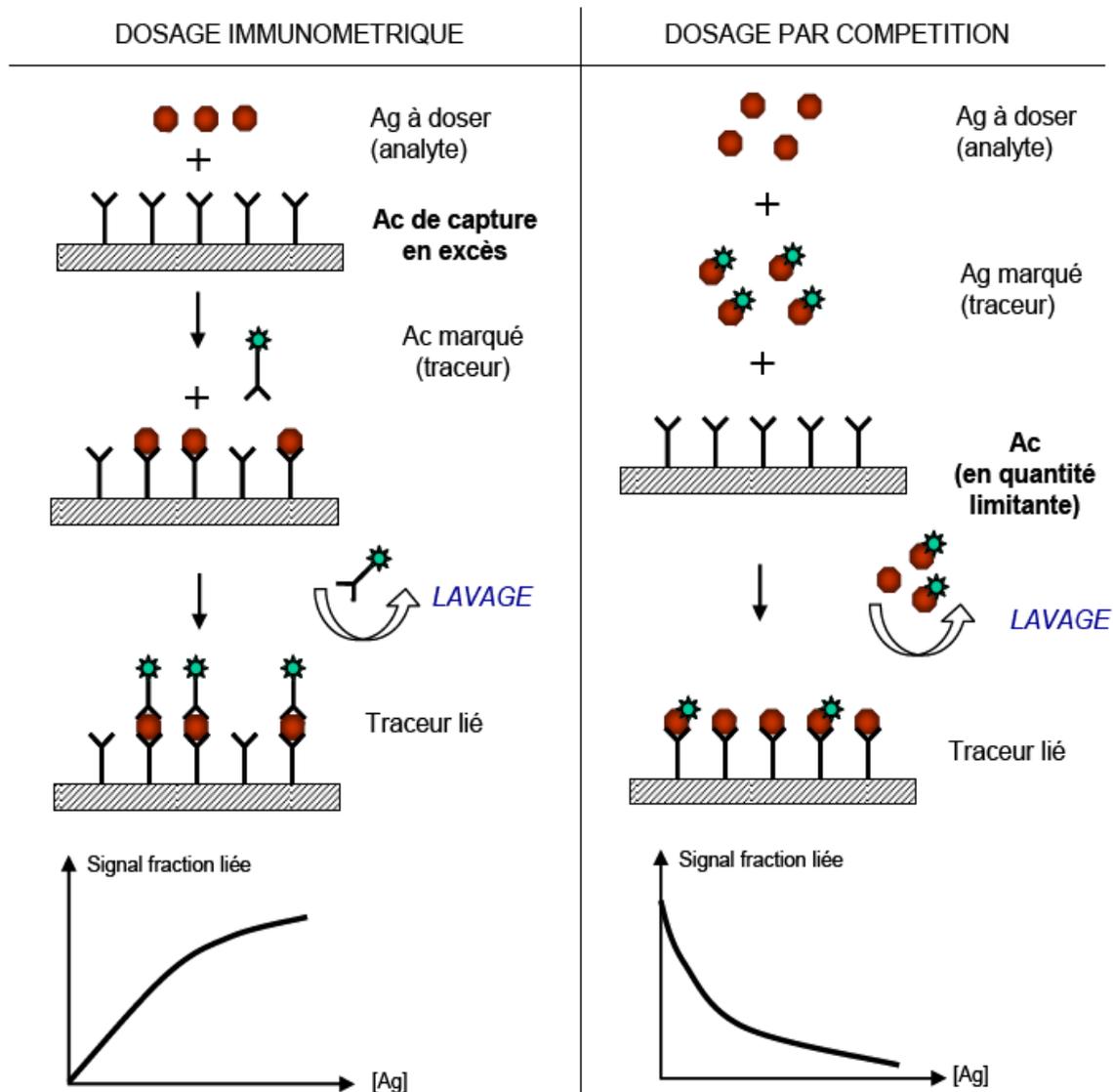


Figure 12 : Schéma-type des dosages immunométrique et compétitif (sur phase solide) (D'après la thèse de Laure-Marie NEUBURGER)

Les avantages des méthodes de type sandwich sont liés à l'utilisation de deux anticorps (monoclonaux si possibles) dont la spécificité de reconnaissance pour deux sites différents de l'antigène assure la spécificité de la méthode. Pour fournir un « faux positif » correspondant à une autre molécule confondue avec l'antigène, cette molécule doit posséder les deux même épitopes. En choisissant bien les épitopes, les interférences avec d'autres molécules présentant une forte homologie peuvent être réduites. Cependant, ces interférences

restent possibles. Dans un dosage par compétition, les antigènes et les antigènes marqués entrent en compétition pour un nombre limité de sites de fixation portés par les anticorps. La sensibilité maximale est obtenue lorsque la concentration de l'anticorps et de l'antigène marqué tend vers zéro, alors que pour le format en sandwich, la sensibilité est maximale lorsque la concentration de ces réactifs tend vers l'infini. Pour cette dernière technique, les réactifs étant introduits en excès, ces conditions favorisent (sur le plan thermodynamique et cinétique) la formation du complexe et améliore la sensibilité (Grassi, Creminon et al. 1996).

1.2.2.4. Méthodes de détection

La plupart des dosages immunologiques emploient des molécules marquées permettant la révélation du complexe immun formé. Ce signal est porté par un marqueur lié (de façon covalente ou non) à l'Ac ou à l'Ag. Notons qu'il existe des systèmes sans marquage, notamment le biocapteur BiAcore, basé sur une mesure de résonance de plasmon, mais qui est rarement utilisé en routine pour le dosage. De nombreux marqueurs peuvent être employés (Pelizzola, Bombardieri et al. 1995). Il s'agit le plus souvent d'enzymes (avec formation d'un produit coloré ou luminescent), de marqueurs fluorescents, luminescents ou radioactifs.

Les premiers dosages développés utilisaient des traceurs radioactifs (Yalow and Berson 1959), notamment le Tritium (^3H) et l'Iode 125 (^{125}I), ce dernier étant le marqueur le plus utilisé en radioimmunoanalyse, en raison de sa forte activité spécifique. Les dosages RIA sont en général très sensibles, et permettent une mesure directe du signal. De plus, le marquage radioactif entraîne très peu de modification de la molécule, préservant ainsi son immunoréactivité. Cependant, pour des raisons de sécurité, ils nécessitent des précautions importantes de manipulation, et sont rarement entièrement automatisés. Grâce aux travaux de Engvall et Perlman permettant le marquage enzymatique (Engvall and Perlmann 1971), de nombreuses méthodes de dosage immunoenzymatique EIA se sont développés. La détermination de la concentration d'antigène marqué se fait en utilisant un substrat, généralement modifié par rapport au substrat naturel, qui conduira après réaction avec l'enzyme à la formation d'un produit portant le signal. Les dosages immunoenzymatiques sont utilisés en routine pour le dosage de nombreux composés, et permettent d'atteindre de très bonnes sensibilités (jusqu'aux attomoles ie. 10^{-18} moles, voire aux zeptomoles ie. 10^{-21} moles d'analyte) notamment grâce au phénomène d'amplification du signal inhérent au *turnover* de l'enzyme (Cousino, Jarbawi et al. 1997). En général, les dosages EIA sont utilisés en format

hétérogène avec une mesure indirecte du signal : après élimination du traceur non engagé dans les complexes immunologiques par une étape de séparation (étape de lavage), le substrat est ajouté ; puis après réaction enzymatique (étape de révélation), le produit formé est quantifié. Les méthodes par fluorescence ont été très développées ces dernières années en raison de leur haute sensibilité (Harma, Soukka et al. 2000) et de leur rapidité. Elles permettent en effet une mesure en direct, évitant toute étape de révélation.

1.2.2.5. Avantages et limitations

Les immunodosages sont actuellement les méthodes de choix pour la bioanalyse, ceci étant lié à leur facilité de mise en œuvre, le faible coût d'analyse et le haut débit associé à ces techniques. En effet, cette méthode utilise couramment des plaques de titration permettant l'analyse simultanée de 96 ou 384 échantillons sur le même support. La sensibilité obtenue au regard du volume d'échantillon consommé est également un atout majeur. Cependant, la présence d'une molécule possédant un épitope semblable à l'épitope de l'antigène à analyser peut entraîner une réaction avec l'anticorps utilisé, et ceci quelque soit le format de dosage. Dans ce cas, les interférences aboutissent à une sous estimation de la concentration de l'analyte. Une autre source d'erreur apparaît lors de liaisons non spécifiques entre les réactifs, par l'intermédiaire de substances pontant les réactifs (Boscato and Stuart 1986), ou simplement par adsorption, aboutissant à une surestimation de l'analyte. Malgré une très forte sensibilité et une facilité de mise en oeuvre, les immunodosages ne permettent pas d'identifier formellement et sans ambiguïté le composé qui est analysé, et la spécificité des anticorps utilisés ne permet pas toujours d'éliminer les réactions croisées avec des molécules interférentes. Il est alors nécessaire de se tourner vers des techniques alternatives permettant d'identifier les molécules analysées. Parmi ces techniques, la spectrométrie de masse est un outil en plein essor pour la bioanalyse car elle présente un gain en spécificité. Déjà largement utilisée pour la quantification de petites molécules, elle tend à se développer pour l'analyse des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs.

1.2.3. L'immunomarquage par immunohistochimie

1.2.3.1. Principe

L'anatomopathologie, en tant que spécialité médicale qui se consacre à l'étude macro- et microscopique des tissus pathologiques, est avant tout l'examen indispensable pour établir un diagnostic et, en complément, intervient parmi les disciplines utilisées dans le cadre de la recherche en oncologie. Ces études tissulaires sont souvent réalisées à partir de biopsies (fragments de tissus ou d'organes). Ces prélèvements sont conservés par inclusion dans des blocs de paraffine ou par congélation. L'utilisation de ces biopsies dans des études anatomopathologiques nécessite la réalisation d'échantillons observables au microscope optique à partir des blocs, sous la forme de lames histologiques, ainsi que la révélation de l'expression de molécules d'intérêt. La réalisation d'études anatomopathologiques requiert tout d'abord l'amincissement des échantillons par le découpage, à l'aide d'un microtome, de lamelles de tissus très fines ($5\mu\text{m}$) qui seront ensuite placées sur des lames de verre. Il faut ensuite procéder à la coloration de chaque lame pour révéler les structures tissulaires et cellulaires ou évaluer la répartition et la concentration de molécules d'intérêt. Une méthode couramment utilisée pour la localisation de molécules particulières est l'immunohistochimie. Cette technique est basée sur les principes de la réaction Ac/Ag du système immunitaire. Elle permet de localiser des antigènes (très souvent des protéines ou fragments de protéines) dans des tissus, cellules, organites cellulaires, etc. Le réactif principal est un anticorps dirigé contre l'antigène à marquer. Des traceurs fixés directement ou indirectement sur cet anticorps permettent de voir la réaction. Le schéma général d'une réaction immunohistochimique est exposé Fig. 13.

Une immunoréaction est donc composée de trois éléments principaux :

- La préparation (tissu, cellule, organite subcellulaire...) contenant l'antigène à étudier
- Un anticorps dirigé contre l'antigène recherché
- Le système révélateur qui permet de visualiser l'immunoréaction

Une observation microscopique des lames histologiques marquées permet d'évaluer la quantité et la localisation des anticorps fixés au sein de la cellule et des tissus, et par extrapolation d'évaluer la présence de l'antigène correspondant. Bien que maîtrisées car utilisées en routine depuis de nombreuses années, ces pratiques présentent des limites qui ont conduit à l'émergence de nouveaux protocoles expérimentaux tels que les tissus micro array (TMA).

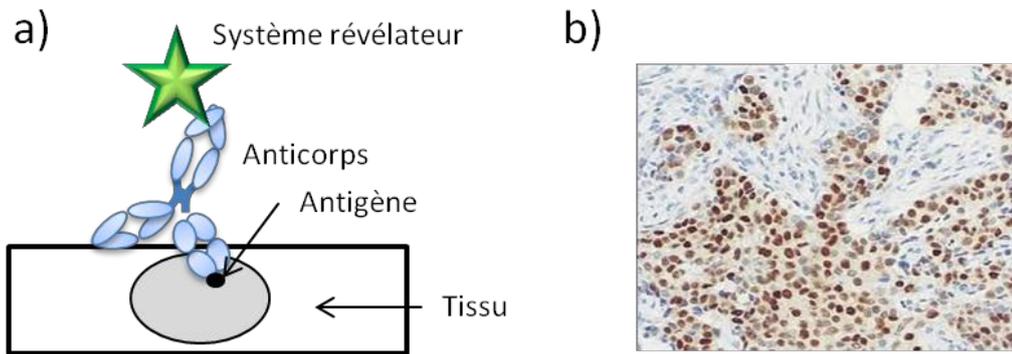


Figure 13 : Immunohistochimie : (a) Les différentes composantes d'une immunoréaction. (b) Image d'une lame histologique.

1.2.3.2. Les tissus micro array

La technologie des Tissue MicroArray vise à dépasser les problèmes posés par les méthodes classiques d'exploration de tissus par la miniaturisation des échantillons. Au lieu de réaliser des coupes complètes de chaque bloc de paraffine contenant une biopsie, des carottes de tissu sont prélevées au sein de chaque biopsie et sont organisées au sein d'une matrice lignes/colonnes dans un nouveau bloc, qui est alors traité comme un bloc classique. Les premières publications présentant la technique des Tissue MicroArrays et ses avantages par rapport aux méthodes classiques d'exploration de tissus datent de la fin des années 90 (Kononen, Bubendorf et al. 1998 ; Bubendorf, Nocito et al. 2001; Kallioniemi, Wagner et al. 2001). Depuis cette période, des centaines d'articles utilisant ce procédé ont été publiés, majoritairement pour la caractérisation et l'analyse de marqueurs tumoraux. Quelques exemples typiques pourraient être les travaux qui explorent l'expression d'un marqueur selon l'organe (Lugli, Tornillo et al. 2004), ou qui étudient le rôle d'une molécule particulière dans la carcinogénèse colorectale et son lien avec le pronostic des patients (Wu, Gu et al. 2003).

La technique expérimentale des TMA commence par la construction d'un plan de fabrication du bloc TMA. Il s'agit de définir une carte TMA décrivant l'échantillon à placer dans chaque case de la matrice lignes/colonnes du bloc (Fig. 14). Le plan de fabrication du bloc TMA étant défini, il s'agit alors de réaliser le bloc en tant que tel, selon le processus décrit Figure 15. Le microarrayer permet l'insertion des blocs donneurs dans les trous du bloc receveur. Le bloc est ensuite traité comme un bloc biopsie standard, avec coupes et coloration des lames obtenues. L'exploitation des lames passe par une étape extensive d'acquisition de

données qui sont alors utilisées dans des études statistiques, d'analyse de données, etc. Mais ces techniques, si elles permettent de dépasser certains problèmes posés par les méthodes classiques, posent encore des problèmes techniques et conceptuels dont la résolution partielle peut éventuellement être apportée par l'outil informatique.

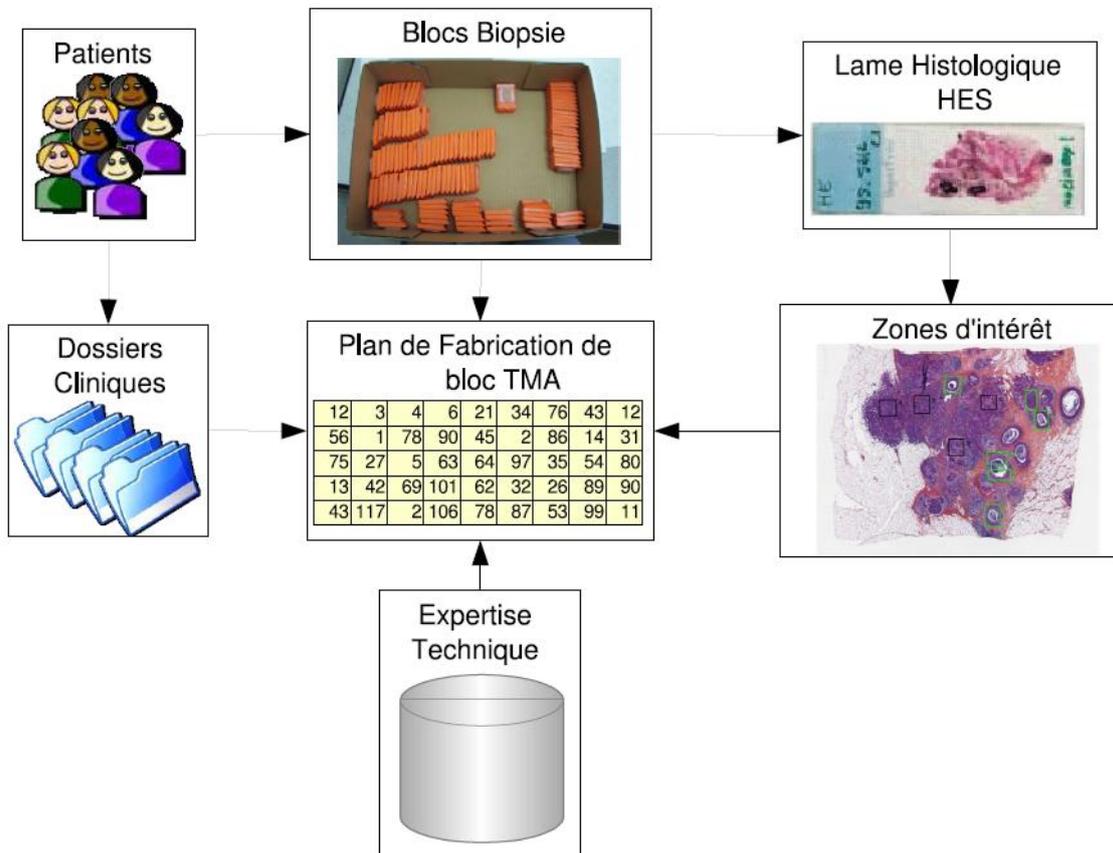


Figure 14 : Construction du plan de fabrication TMA. (D'après la thèse de Julie Bourbeillon, 2007)

Dans un contexte de recherche en oncologie, les données ainsi acquises doivent éventuellement permettre l'exploration du rôle des molécules étudiées dans la transformation tumorale ou l'identification de nouveaux marqueurs tumoraux, molécules impliquées dans le processus de cancérisation pouvant servir de cibles pour des traitements, des tests de dépistage ou pouvant être utilisées comme indicateurs prédictifs de pronostic pour les patients.

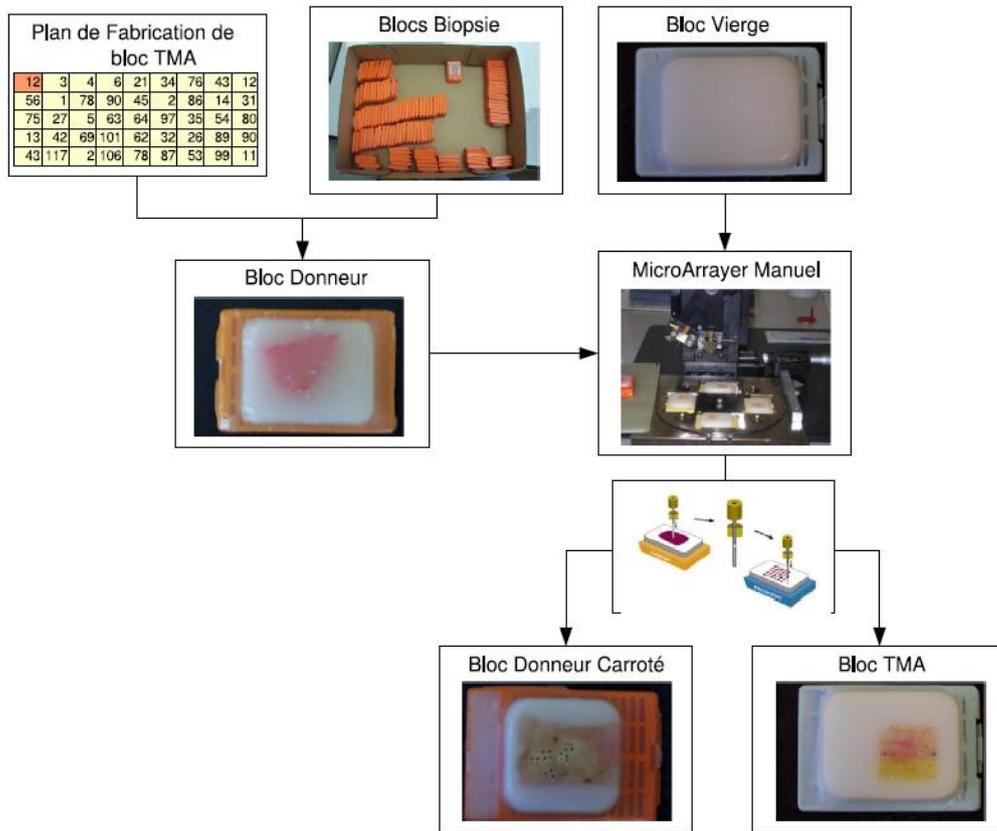


Figure 15 : Construction du bloc TMA - Pour chacun des blocs de biopsie et chaque emplacement de prélèvement définis dans le plan de fabrication du bloc, une carotte est réalisée puis insérée à la position prévue avec un microarrayer, ici un modèle manuel. Le résultat final consiste en blocs biopsie perforés et un bloc TMA correspondant au plan de fabrication. (D’après la thèse de Julie Bourbeillon, 2007)

1.2.4. La cytométrie de flux

La cytométrie de flux permet la numération des cellules exprimant un Ag (le plus souvent membranaire) tout en les caractérisant. C'est la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) qui permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier. La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de particules isolées ou de cellules, bactéries, etc. (vivantes ou mortes) entraînées par un flux liquide ou gazeux. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Il s'agit d'analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques des particules. Ils correspondent aux phénomènes

de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto-fluorescence de certaines cellules et aux propriétés de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires. La fluorescence émise peut être spontanée, mais le plus souvent, elle est apportée à la cellule par un fluorochrome. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée sous forme de photons d'une longueur d'onde plus élevée. Il existe différents types de fluorochromes. Les fluorochromes à affinité propre pour un constituant cellulaire (ou sonde biochimique) : par exemple pour les mesures d'ADN, d'ARN, de protéines, du pH, de calcium contenus dans la cellule. Et les fluorochromes couplés à un ligand spécifique. Cette spécificité peut être amenée par un couplage du fluorochrome à un anticorps ou un ligand spécifique d'un constituant cellulaire. Les signaux des fluorochromes séparés par des filtres optiques sont collectés par des photo-multiplieurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur par l'intermédiaire d'une composante informatique et optique (miroir dichroïque et filtre optique). Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées. La fonction tri des cytogrammes en flux les plus évolués permet de trier physiquement une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques.

1.3. Les principaux antigènes circulants du cancer du sein utilisés en immunodosages

Les marqueurs circulants protéiques sont des protéines, des glycoprotéines ou des peptides, sécrétés ou libérés par les cellules tumorales ou par leur environnement et plus ou moins spécifiques de celles-ci. La quantité du marqueur circulant, détectée dans le fluide biologique, est un estimateur indirect de la masse tumorale ou de l'agressivité d'une tumeur, permettant ainsi l'évaluation de la progression tumorale et/ou de l'efficacité thérapeutique. Un marqueur ne peut être utile pour le dépistage ou pour la détection précoce d'un cancer que s'il permet de le détecter à un stade curable chez des sujets asymptomatiques ou peu symptomatiques. Il doit n'être qu'exceptionnellement anormal chez des sujets n'ayant pas de cancer. De très nombreux exemples de marqueurs circulants existent, parmi lesquels on peut citer le *prostate specific antigen* (PSA) pour le cancer prostatique, la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) pour les tumeurs choriocarcinomeuses ou encore

l'alphafoetoprotéine (α -FP) pour le carcinome embryonnaire du testicule. Pour le cancer du sein, l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) a été pendant longtemps le seul marqueur circulant utilisé. Actuellement, les marqueurs les plus utilisés sont ceux qui mesurent le niveau circulant de fragments de : MUC1–*polymorphic epithelial mucin* (MUC1–PEM), *cancer antigens* (CA15–3, CA 27–29, CA 549, ...), *mucin-like carcinoma-associated antigen* (MCA). D'autres marqueurs ont été évalués appartenant au groupe des kératines : antigène tissulaire polypeptidique (TPA, TPS ou Cyfra 21.1). Plus récemment, la mesure d'une fraction circulante de HER2 a été proposée comme marqueur pronostique des cancers mammaires surexprimant HER2. De plus, un travail original a étudié l'intérêt du dosage urinaire du facteur en trèfle 1 (PS2–TFF1) dans les cancers du sein hormonodépendants (Chenard, Tomasetto et al. 2004). Il semble donc intéressant de faire le point sur l'apport de ces différents marqueurs dans la pathologie mammaire, en soulignant leurs caractéristiques biologiques et leur intérêt clinique.

1.3.1. L'antigène carcino embryonnaire

Isolé en 1965 par Gold et Freedman (Krupey, Gold et al. 1968), l'antigène carcino embryonnaire (ACE) est une protéine onco-foetale dont la synthèse est très réduite après la naissance, mais sa répression n'est toutefois pas totale chez l'adulte, ce qui explique l'existence de quantités sériques mesurables d'ACE. Cet antigène dont le poids moléculaire est de 180 kDa comporte 641 acides aminés et est composé en moyenne de 45 % de protéines et de 55 % d'hydrates de carbone. Les anticorps monoclonaux ont permis de mieux individualiser l'ACE au sein de la famille hétérogène des glycoprotéines membranaires, codées par environ dix gènes localisés sur le chromosome 19. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de révéler sa présence dans des tissus humains adultes non pathologiques. C'est un antigène présent à la surface du pôle apical des cellules épithéliales de l'intestin grêle, du côlon, du rectum, du pancréas, du poumon et du sein. La quantité d'antigène mis en évidence dans les tissus normaux reste cependant beaucoup plus faible que dans les tissus néoplasiques. Le dosage de l'ACE sérique s'effectue, habituellement, par une méthode immunométrique. Chez la femme, la limite supérieure des valeurs usuelles varie entre 3 et 5 ng/ml. L'ACE est très fortement exprimé par de nombreux adénocarcinomes, en particulier colorectaux et pulmonaires. D'autres cancers peuvent être à l'origine d'une élévation de l'ACE (estomac, pancréas, foie, thyroïde, sein, ovaire, tumeurs neuroendocrines, lymphome et mélanome). L'ACE peut être élevé dans 10 à 15 % des cancers du sein non

métastatiques et dans 35 à 40 % des cancers du sein en phase métastatique. Le niveau et la fréquence de l'élévation de ce marqueur sont corrélés avec la progression tumorale (Maric, Ozretic et al. 2011).

1.3.2. *MUC1*

Le gène *MUC1*, situé sur le chromosome 1 q21-24, a été cloné en 1990 (Gendler, Lancaster et al. 1990) et la structure de la protéine, appelée MUC1 ou *polymorphic epithelial mucin* (PEM) a été caractérisée. Il s'agit d'une protéine transmembranaire possédant trois régions distinctes : un domaine cytoplasmique de 69 acides aminés, un petit domaine transmembranaire de 31 acides aminés et un domaine extracellulaire très important, constitué de séquences répétées en tandem d'une longueur de 20 acides aminés. Cette séquence répétitive est très riche en résidus sérine, thréonine et proline. Sa glycosylation aboutit à une structure de mucine. Le nombre de séquences répétitives varie entre 25 et 125 d'un individu à l'autre, en raison du haut degré de polymorphisme de ce gène. La MUC1-PEM est présente en faible quantité au niveau du pôle apical des cellules mammaires normales, tapissant notamment l'intérieur des canaux galactophores et des lobules. Son expression augmente lors de la lactogénèse mais également au cours de la transformation maligne. Dans les cellules cancéreuses, la localisation de cette protéine se modifie et on peut la trouver tout autour des cellules épithéliales qui présentent souvent une perte complète de polarité. Ainsi, la présence de cette glycoprotéine sur l'ensemble de la membrane cytoplasmique joue probablement un rôle dans la perte d'adhésion des cellules cancéreuses entre elles. La MUC1-PEM est presque toujours glycosylée de façon aberrante en cas de cancer mammaire, avec des chaînes polysaccharidiques latérales généralement moins branchées et plus courtes, ce qui la rend ainsi antigénique. Cette variabilité phénotypique évolue chez une même patiente au cours de sa maladie. La MUC1-PEM constitue une cible pour des anticorps utilisés dans différents kits de dosages de marqueurs circulants (Granowska, Mather et al. 1990). Toutefois, sa détection est parfois délicate en raison de la présence d'autoanticorps anti-mucines circulants. En effet, les anomalies de structure très répétitives de cette molécule aboutissent à une présentation d'épitopes antigéniques et à une immunisation spontanée dont témoignent les taux d'anticorps circulants, ainsi que les complexes immuns qui ont pu être détectés chez des patientes atteintes de tumeurs mammaires (Gourevitch, von Mensdorff-Pouilly et al. 1995). Ces anticorps peuvent entrer en compétition avec ceux des tests. Le test CA 15-3 qui reconnaît un fragment de la MUC1-PEM est le principal test utilisé dans les cancers mammaires.

1.3.3. Le CA 15-3

Le test CA 15-3 qui reconnaît un fragment de la MUC1- PEM est le principal test utilisé dans les cancers mammaires. Il a été décrit par Tobias en 1985. Le dosage du CA 15-3 sérique s'effectue par des techniques immunométriques, fondées sur le principe du sandwich entre deux anticorps (anticorps 115D8 fixé sur le support et anticorps DF3 marqué) (Duffy, Evoy et al. 2010). Le 115D8, dirigé contre la membrane du globule graisseux du lait humain (Hilkens, Buijs et al. 1984), a été obtenu à partir de souris immunisées avec des membranes de globules lipidiques de lait humain. Le DF3, dirigé contre la membrane de cellules humaines de cancer du sein (Kufe, Inghirami et al. 1984), a été obtenu à partir de souris immunisées avec un extrait d'une lignée cellulaire (MCF-7) d'un carcinome du sein métastatique humain. L'épitope réagissant avec l'anticorps DF3 a été identifié et est constitué par une région de la séquence Thr-Arg-Pro-Ala-Gly-Ser. Il n'existe pas de valeur usuelle standardisée du CA 15-3 du fait d'une variabilité interméthode (Huber, Bischof et al. 1996). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires U/ml ou kU/l. La valeur seuil la plus souvent admise est de 30 U/ml. Le CA 15-3 n'est pas un marqueur circulant spécifique du cancer du sein. En effet, des concentrations de CA 15-3 supérieures aux valeurs usuelles sont observées chez environ 6 % des sujets sains (Devine, Duroux et al. 1995). De plus, des affections bénignes (mammaires, hépatiques, bronchopulmonaires, digestives inflammatoires, endocrines et auto immunes) ou malignes extramammaires (ovariennes, colorectales, pancréatiques, hépatobiliaires, pulmonaires, gastriques, thyroïdiennes) peuvent être associées à une élévation du CA 15-3. Ces élévations non spécifiques du CA 15-3 sont à l'origine d'un pourcentage important de faux-positifs. Si la spécificité mammaire du CA 15-3 semble limitée, sa sensibilité au moment du diagnostic initial n'est guère meilleure. En effet, moins d'un tiers des cancers du sein non métastatiques, tous stades confondus, a des concentrations supérieures à la valeur seuil du CA 15-3 (Giai, Roagna et al. 1996). Ainsi, le CA 15-3 ne peut pas être utilisé comme un moyen de dépistage ou de diagnostic précoce du cancer du sein, compte tenu de sa faible sensibilité et spécificité. En cas de cancer mammaire, la valeur sérique du CA 15-3 est généralement corrélée au stade de la maladie. Plus le stade est avancé, plus la concentration du CA 15-3 est élevée (De La Lande, Hacene et al. 2002). Environ deux tiers des patientes, avec une première évolution métastatique, ont une élévation du CA 15-3. Le délai d'élévation du CA 15-3 avant la détection de la première métastase varie de trois mois à plus d'un an. Le principal intérêt du CA 15-3 en phase métastatique déclarée est d'aider à l'évaluation thérapeutique.

1.3.4. HER2

Le gène *HER2* (*human epidermal growth factor receptor 2*) a été identifié au niveau du chromosome 17q21. Il appartient à la famille HER, qui code pour quatre récepteurs transmembranaires, appelés HER1 (c-erb B1 ou EGFR *epidermal growth factor receptor*), HER2 (c-erb B2), HER3 (c-erb B3) et HER4 (c-erb B4). HER2 est un récepteur particulier dans la mesure où il ne possède pas de ligand spécifique de grande affinité. La protéine HER2 a une homologie structurale avec l'EGFR et déclenche une cascade de réactions biologiques qui sont à l'origine de la prolifération cellulaire. La surexpression de HER2 est très fortement corrélée à l'amplification du gène mise en évidence par hybridation in situ en fluorescence (FISH). Les cellules épithéliales normales de la glande mammaire possèdent environ 20 000 à 50 000 récepteurs HER2 au niveau de leur surface cellulaire. Il en existe en revanche plusieurs millions au niveau des cellules tumorales mammaires qui surexpriment HER2. La surexpression de HER2 peut être détectée dans 20 à 25 % des cancers du sein invasifs, mais aussi dans 60 à 70 % des cancers canaux in situ (CCIS). Enfin, les carcinomes de type lobulaire semblent ne pas ou peu surexprimer HER2. Par ailleurs, des données publiées suggèrent une bonne corrélation entre la surexpression de HER2 au niveau de la tumeur primitive et les métastases. Pour les cancers infiltrant, la surexpression de HER2 constitue un facteur de mauvais pronostic. En revanche, elle est prédictive d'une réponse au trastuzumab. Le récepteur HER2 est une glycoprotéine de 185 kDa constituée de 1255 acides aminés. Il possède un domaine de liaison extracellulaire (*extra cellular domain*, ECD), présent à la surface des cellules cancéreuses mammaires et riche en cystéine, un domaine transmembranaire lipophile et un domaine intracellulaire possédant une activité tyrosine-kinase. Après sa libération par protéolyse, l'ECD de HER2 est une glycoprotéine de poids moléculaire compris entre 97 et 115 kDa, appelée p105. L'ECD soluble peut être quantifié dans le sérum des patientes par ELISA grâce à des anticorps monoclonaux (Sias, Kotts et al. 1990 ; Pichon, Hacene et al. 2004). Les différentes séries publiées dans la littérature montrent une augmentation des valeurs sériques d'ECD pour 0 à 38 % des patientes ayant un cancer mammaire non métastatique (moyenne, 18,5 %), et pour 23 à 80 % (moyenne, 43 %) des patientes ayant un cancer mammaire métastatique (Fehm, Maimonis et al. 1997; Meenakshi, Kumar et al. 2002). Ce dosage peut être utile lorsque l'expression de HER2 n'a pas pu être établie sur la tumeur primitive (Pallud, Guinebretiere et al. 2005). Son élévation pourrait alors témoigner de l'expression de HER2 par la tumeur. En revanche, une valeur sérique normale ne peut pas être corrélée à une absence de surexpression de HER2 par la tumeur. L'élévation

de l'ECD dans les cancers précoces témoigne de l'agressivité de la tumeur et paraît associée à une augmentation du risque de métastases viscérales et de cancers mammaires controlatéraux (Saghatchian, Guepratte et al. 2004). Une augmentation des valeurs sériques d'ECD a un impact péjoratif sur la survie globale.

1.3.5. Les cytokératines

Les cytokératines participent, avec les microtubules et les microfilaments d'actine, à la formation du cytosquelette de la plupart des cellules épithéliales (Seregni, Coli et al. 2004). Il n'y a pas de cytokératine dans les cellules sanguines. Les cytokératines humaines comprennent 20 polypeptides et sont séparées en deux sous-familles. Le groupe I contient les cytokératines 9 à 20 qui sont acides. Le groupe II contient les cytokératines 1 à 8 qui sont neutres ou basiques. Les cellules épithéliales expriment les kératines par paires, l'une appartenant au groupe I, l'autre au groupe II. Dans les cellules épithéliales de nombreux tissus, les cytokératines 8/18 et 8/19 sont souvent coexprimées. Ces paires de cytokératines sont également exprimées dans les cancers épithéliaux. Différents tests permettent de mesurer des fragments de cytokératine 8, 18 et 19 présents dans le sérum, dont les plus courants sont le TPA, qui reconnaît les kératines 8, 18 et 19 ; le TPS, qui reconnaît les kératines 8 et 18 ; le Cyfra 21.1, qui reconnaît les kératines 8 et 19 (Barak, Goike et al. 2004; Seregni, Coli et al. 2004; Sliwowska, Kopczynski et al. 2006). Les cytokératines 8, 18, 19 étant surtout produites au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire, ces marqueurs constituent un reflet de l'activité proliférative des tumeurs. Dans le domaine de l'oncologie, ces fragments de kératines sont utilisés comme des marqueurs ubiquitaires non spécifiques de tissu, dont l'intérêt réside dans leur corrélation au degré de prolifération tumorale. Une étude a montré le rôle pronostique péjoratif indépendant d'une élévation du Cyfra 21.1 ($\geq 3,5$ ng/ml) chez 86 patientes atteintes d'un cancer mammaire (Nakata, Ogawa et al. 2000). En cas d'évolution clinique sans élévation du CA 15-3 ni de l'ACE, il peut être utile de trouver un autre marqueur efficace.

1.3.6. La mammaglobine

La mammaglobine humaine (hMAM) a été identifiée par Watson et Fleming en 1996 en utilisant des techniques de PCR différentielles (Watson and Fleming 1994). La MAM

appartient à la famille de protéine uteroglobine/Clara qui sont de petites protéines épithéliales sécrétées, qui a récemment été nommée sécrétoglobine avec 23 membres connus. La MAM a été trouvé dans les cellules épithéliales du sein et est surexprimée dans les cancers du sein (Watson and Fleming 1996). En raison de son expression spécifique dans le sein, la MAM est un candidat d'intérêt comme marqueur diagnostique du cancer du sein. L'expression de la MAM a été étudiée en premier par Watson et Fleming dans 35 carcinomes du sein par RT-PCR et Northern blot (Watson and Fleming 1996). Une surexpression de MAM est observée dans 23% des tumeurs testées sans corrélation avec une histologie spécifique. Le même groupe a étudié ensuite la production de la protéine MAM par IHC et montre une forte réactivité dans 81 des 100 tumeurs du sein testées. La détection du complexe protéique MAM par un essai sensible peut avoir plusieurs avantages pour le diagnostic. Les ELISA peuvent être adaptées pour la détection de ce complexe protéique sécrété que l'on retrouve circulant dans le sang. Il est plus probablement sécrété par les petites tumeurs que par les cellules tumorales circulantes dans les stades précoces de la maladie. Le complexe protéique de la MAM peut être exploité de différentes façons pour le diagnostic : la détection directe de la protéine ; la détection des cellules immunes réagissant avec elle ; le dosage des anticorps circulants dirigés contre la MAM. En utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la MAM recombinante, Fleming et Watson montrent pour la première fois que la MAM sécrétée est détectable dans le sérum de patientes (Fleming and Watson 2000). Dans cette étude, des échantillons de sérum de 25 contrôles et 135 patientes atteintes de cancer du sein ont été analysés. Seulement un échantillon sain donne un résultat positif alors que 33% des cancers du sein primaires et 44% des cancers métastatiques sont positifs. Alors que l'utilisation des essais avec la protéine MAM en est toujours à ses débuts, les approches utilisant des essais et des Ac plus spécifiques des complexes natifs permettront une meilleure information pour le diagnostic et le pronostic de la maladie dans le futur.

En pratique, bien que de nombreux marqueurs circulants aient été identifiés, aucun d'entre eux n'est recommandé pour le dépistage des cancers mammaires dans la population générale ni pour une utilisation diagnostique en cas d'anomalie mammaire. L'intérêt des marqueurs circulants et principalement du CA 15-3 est actuellement limité au diagnostic de métastase et à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique en cas de maladie générale en association avec les éléments cliniques et paracliniques.

2. Les puces à anticorps comme outil diagnostique

2.1. Généralités

2.1.1. Définition d'une puce

La technologie des puces à biomolécules a pris naissance à la suite des travaux de Roger Ekins décrivant les avantages potentiels d'un système miniaturisé, les micro-spots, par rapport à d'autres systèmes d'étude d'interactions moléculaires (Ekins 1989 ; Ekins, Chu et al. 1990).

Cette technologie repose sur trois étapes fondamentales :

- le dépôt des molécules dites "sondes" sur un support solide,
- les interactions cibles-sondes,
- la détection du signal issu de cet appariement.

La technologie des biopuces permet d'effectuer simultanément des tests miniaturisés, de haute sensibilité, sur plusieurs molécules d'intérêt présentes dans un échantillon biologique de faible volume (Ekins and Chu 1999 ; MacBeath and Schreiber 2000 ; Pandey and Mann 2000). Une biopuce est constituée d'un support solide (silice, verre, métal ou polymère) sur lequel sont immobilisées des biomolécules appelées « sondes » (fragments d'acides nucléiques, protéines, peptides, sucres, cellules ou tissus). Les sondes sont immobilisées et organisées en matrices (d'où le terme de « microarrays ») sur le substrat solide. Chaque sonde est localisée en des endroits définis appelés « plots » ou « spots ». Un spot contient un grand nombre de copie d'une même molécule sonde. Chaque sonde a été choisie pour reconnaître spécifiquement, par affinité, une molécule cible (ex : protéines, acides nucléiques...) éventuellement présente dans un milieu biologique à analyser. La surface de la puce est mise en contact avec l'échantillon biologique à analyser (sérum, extrait cellulaire ou autre échantillon biologique d'intérêt). Après élimination des molécules en excès, la biopuce est analysée spot par spot pour détecter et déterminer quelle sonde a capturé une cible. Les systèmes de détection de biomolécules cibles sur biopuces peuvent être basés sur différentes techniques. La plus classique est désormais certainement la fluorescence. On peut recenser également la chimiluminescence, la spectrométrie de masse, la radioactivité, les mesures électrochimiques, optiques, massiques, électriques.

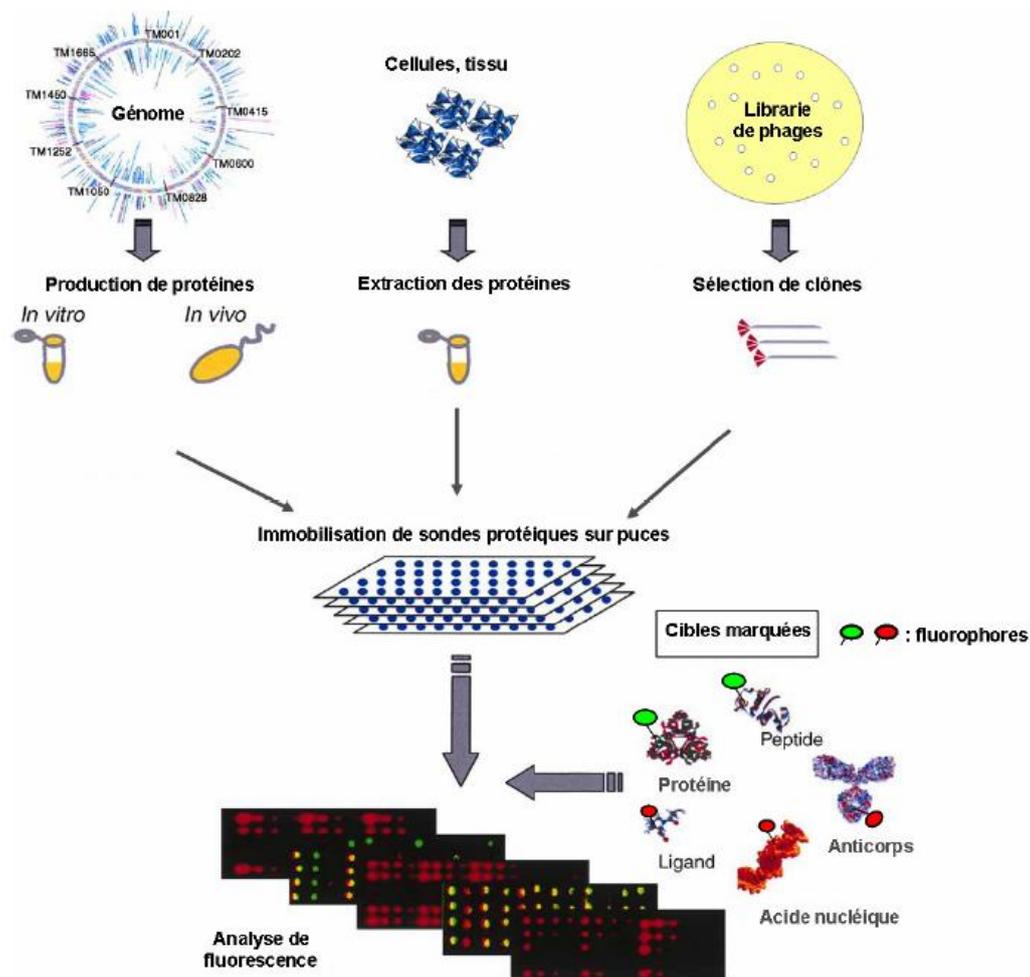


Figure 16 : Exemple de puces à protéines effectuées sur support solide plan. Détection de différentes interactions moléculaires par analyse de fluorescence (Sakanyan 2005).

La figure 16 montre quelques exemples de puces à protéines: les sondes protéiques sont immobilisées sur des surfaces solides planes et incubées avec des biomolécules cibles marquées, dans ce cas par des fluorophores. Les interactions moléculaires spécifiques sont détectées après analyse de la fluorescence (Sakanyan 2005).

2.1.2. Puces à ADN

Les puces à ADN peuvent être élaborées selon deux stratégies différentes : i) les sondes peuvent être préparées individuellement, puis immobilisées sur la surface de la puce (méthode *ex situ*) (Sчена, Heller et al. 1998), ou ii) les sondes sont synthétisées directement sur la surface de la puce par synthèse chimique d'oligonucléotides sur la surface (méthode *in situ*) (Fodor, Read et al. 1991; Gao, Gulari et al. 2004). Le développement de ces biopuces a permis de mettre au point des essais miniaturisés, à très haute densité, fabriqués sur des substrats en verre (lames de microscope).

Ces puces permettent d'analyser l'expression de la totalité du génome d'un organisme au sein d'une seule expérience (DeRisi, Iyer et al. 1997 ; Wodicka, Dong et al. 1997). L'évolution des technologies a permis de faire émerger des méthodes industrielles de fabrication et de production de puces à ADN de grande qualité (Affymetrix, Agilent). Pourtant, les efforts engagés dans le domaine de la génomique pour analyser les différents processus biologiques, physiologiques et pathologiques n'ont pas permis d'aboutir à une compréhension suffisamment vaste et profonde des phénomènes du vivant. En effet, cette technique reste limitée puisqu'il n'existe qu'une faible corrélation entre l'activité des gènes et l'expression des protéines (Anderson and Seilhamer 1997 ; Gygi, Rochon et al. 1999). Ceci est dû notamment aux modifications post-traductionnelles des protéines, comme le clivage (élimination de la méthionine initiale), l'addition de groupements chimiques (phosphorylation, acétylation) ou d'autres molécules plus complexes (lipides, sucres). Des informations complémentaires sur l'état des protéines sont donc nécessaires afin d'analyser un système biologique complexe. Il apparaît que la compréhension de ces phénomènes nécessite, en plus de l'approche génomique, des analyses au niveau de l'expression des protéines elles mêmes.

2.1.3. Puces à protéines et à anticorps

Le développement des puces à protéines bénéficie de l'expertise liée à l'évolution de la technologie des puces à ADN. L'étude du comportement des protéines nécessite le développement d'outils toujours plus pointus et puissants : électrophorèse sur gel à deux dimensions, chromatographie, spectrométrie de masse, ELISA, Western blot. Les puces à protéines constituent un outil additionnel, permettant d'étudier les interactions protéine/ligand avec un débit encore inatteignable par les méthodes classiques.

Les puces à protéines ("protein array" ou "protein chip") correspondant à l'arrangement ordonné d'un grand nombre d'échantillons sur un support miniaturisé, et pouvant contenir sous toutes leurs formes des protéines actives ou des membres d'une famille de protéines voire même l'ensemble des protéines d'un organisme (protéome). Les puces à anticorps font parti des puces à protéines. Le principe des puces à anticorps est fondé sur la réaction antigène-anticorps entre des protéines à identifier et des anticorps spécifiques immobilisés sur la surface d'un support. On parle également de capteur d'affinité pour définir ce type de dispositif. Le terme de puce sous-entend l'idée de miniaturisation, et la distinction arbitraire entre une macro-puce et une micro-puce repose principalement sur le nombre de spots protéiques déposés par cm², la première en regroupant une vingtaine, tandis que la seconde peut atteindre plus de 1 000 spots, voire même 5 000 pour les plus récentes (Borrebaeck 2006). Pour les systèmes les plus miniaturisés, on parle même de surface inférieure au cm² (Wingren and Borrebaeck 2008).

Globalement, le fonctionnement d'une puce à anticorps se déroule de la manière suivante :

- Un échantillon contenant l'analyte à détecter parmi de nombreuses autres entités est déposé sur le support pour incubation.
- L'anticorps immobilisé à la surface du support joue le rôle d'une "sonde", détectant l'antigène pour lequel il est spécifique. Une liaison faible non covalente (donc réversible) mais à haute affinité va alors se créer entre l'anticorps et l'antigène.
- L'étape de détection permet de révéler cette interaction ainsi créée (Cretich, Damin et al. 2006).

2.1.4. Puces fonctionnelles et analytiques

Les puces à protéines peuvent être divisées en deux grandes catégories (Fig. 17) :

- Les puces fonctionnelles, développées généralement en recherche fondamentale pour étudier les fonctions des protéines (Blackburn and Hart 2005). Un grand nombre de protéines, de peptides ou même la totalité d'un protéome peuvent être immobilisés sur supports (Fig. 17). Ces puces sont utilisées pour analyser des interactions biochimiques entre les protéines et leurs ligands. Elles permettent d'étudier les effets des substrats sur les activités enzymatiques (Zhu and Snyder 2003), les interactions entre les protéines et les acides nucléiques (Bae, Kwon et al. 2003), les cibles pharmaceutiques (Zhu, Bilgin et al. 2001; Kim, Tamrazi et al.

2005), ou d'autres petites molécules, ainsi que d'étudier les activités des hormones (Lee, Kang et al. 2004) ou de déterminer des sites antigéniques ou épitopes (Chiari, Cretich et al. 2005; Poetz, Ostendorp et al. 2005). Contrairement aux méthodes non ciblées, telles que la spectrométrie de masse ou l'électrophorèse sur gel, les puces à anticorps permettent de détecter la(les) protéine(s) d'intérêt avec une bonne reproductibilité et une grande sensibilité. Ces qualités sont de plus en plus exploitées pour étudier l'ensemble des protéines impliquées dans les cancers. Ces systèmes sont néanmoins limités par la disponibilité des anticorps à haute affinité pour la totalité des protéines étudiées, et sont donc supplantés par d'autres techniques (TMA et Western Blot) (Sanchez-Carbayo 2006).

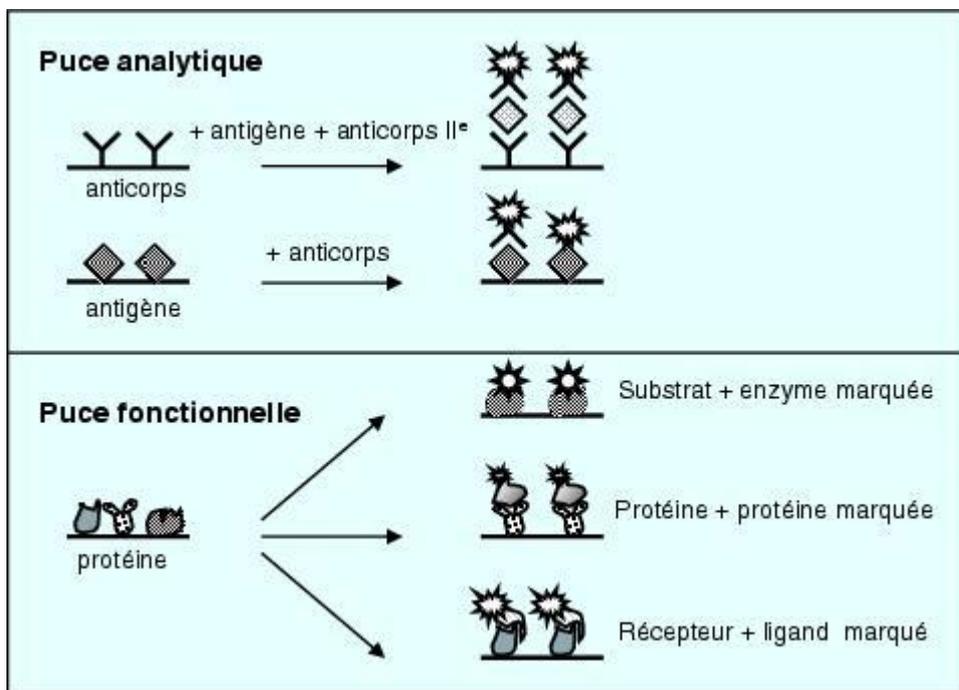


Figure 17 : Types de biopuces à protéines. Les puces analytiques étudient les interactions immunologiques entre une protéine connue et des anticorps par dépôt premier de la protéine ou par réalisation d'une technique sandwich. Les puces fonctionnelles analysent l'interaction entre une protéine sélectionnée et des partenaires qu'elles cherchent à identifier (Zhu and Snyder 2003).

- Les puces de diagnostic ou analytiques, qui permettent de déterminer la présence et/ou l'abondance de protéines d'intérêt présentes dans un milieu biologique complexe comme le sérum (Combaret, Bergeron et al. 2005 ; Hamelinck, Zhou et al. 2005 ; Sanchez-Carbayo, Succi et al. 2006). Des antigènes ou des anticorps sont immobilisés sur le support, pour

pouvoir détecter des interactions spécifiques avec les molécules cibles présentes dans un échantillon biologique (Fig. 17). Ces puces sont utilisées pour le diagnostic des maladies auto-immunes (Joos, Schrenk et al. 2000; Robinson, DiGennaro et al. 2002), génétiques, les infections virales ou bactériennes (Mezzasoma, Bacarese-Hamilton et al. 2002; Neuman de Vegvar, Amara et al. 2003), tumorales (Sanchez-Carbayo, Socci et al. 2006), ou allergiques (Bacarese-Hamilton, Gray et al. 2005). En comparaison de la méthode ELISA traditionnelle en plaque de microtitration 96 puits, l'usage des puces à anticorps est possible pour des quantités très limitées d'analytes (quelques microlitres). C'est ce qui constitue l'intérêt principal de ce dispositif à des fins diagnostiques (Seurynck-Servoss, White et al. 2007).

2.1.5. *L'utilisation des puces dans le cadre du cancer du sein*

Les puces à protéines trouvent leurs applications en recherche fondamentale et dans le domaine biomédical. Les puces dites de diagnostic, permettent de détecter les interactions protéines/ligands impliquées dans différentes pathologies. Des puces à anticorps ont été utilisées pour identifier des protéines exprimées dans le cancer du sein en analysant l'expression différentielle de protéines de lignées cellulaires de cancer du sein (Vazquez-Martin, Colomer et al. 2007) et de tissus cancéreux (Hudelist, Pacher-Zavisin et al. 2004). Une étude comparant l'expression protéique dans des tissus sains et cancéreux de patientes avec un cancer du sein primaire a montré la faisabilité de cette technologie pour la détection de biomarqueurs (Hudelist, Pacher-Zavisin et al. 2004). En effet, les protéines montrant une expression différentielle dans l'échantillon malin sont des protéines déjà connues pour être surexprimées dans le cancer du sein (Nathan, Carter et al. 1997). Les lignées cellulaires dérivées d'un cancer du sein sont un bon modèle pour étudier la maladie. Une étude utilisant une puce à anticorps pour étudier le profil d'expression de cytokines dans des lignées cellulaires humaines de cancer du sein a montré que la surexpression d'IL-8 dans les cellules du sein est associée avec un cancer du sein plus invasif (Lin, Huang et al. 2004). Comme autre exemple, nous pouvons citer l'étude de la protéine MDM2 (*mouse double minute 2*). La surexpression de MDM2 est fréquemment associée avec un cancer métastatique ainsi qu'un mauvais pronostic. Des puces à anticorps ont été utilisées pour identifier les protéines interagissant avec MDM2 dans un extrait cellulaire de la lignée de cancer du sein MDA-MB-453. Les extraits cellulaires ont été appliqués sur la puce et détectés avec un anticorps spécifique dirigé contre MDM2 (Yang, Zong et al. 2006). Un signal positif a été obtenu où un anticorps anti E-cadherine était immobilisé. Comme dernier exemple, on peut citer

l'utilisation de puces à anticorps pour l'identification de biomarqueurs associés à la résistance à la chimiothérapie. La doxorubicine est considérée comme l'agent le plus efficace pour le traitement du cancer du sein. Malheureusement, la résistance à ce traitement est fréquente. En utilisant une puce à anticorps contenant 224 anticorps monoclonaux immobilisés, la lignée cellulaire MD1-MB-231 ainsi qu'une lignée résistante à la doxorubicine dérivant de cette dernière ont été analysées (Smith, Watson et al. 2006). Grâce à cette approche, 5 protéines ont été détectées avec une expression significativement plus faible dans la lignée résistante (cycline D2, cytokératine 18, cycline B1, hnRNP m3-m4 et la forme monophosphorylée de ERK).

Nous pouvons donc constater que la disponibilité de méthodes pour mesurer l'abondance des protéines de façon simultanée dans un essai multiplexé a ouvert de nombreuses opportunités de recherche.

2.2. Support de la puce

2.2.1. Les différents supports solides

Dans la préparation des puces à protéines, l'un des problèmes majeurs réside dans l'ancrage des protéines et le maintien de leur configuration spatiale initiale, condition cruciale pour évaluer les interactions spécifiques impliquées dans leurs fonctions. La liaison des biomolécules au support dépend donc fortement de sa nature. De ce fait, dans le choix du type de support, de nombreux paramètres sont à prendre en compte : les propriétés physicochimiques (résistance physique, stabilité au pH, etc.), l'absence de dénaturation des protéines, l'homogénéité et la morphologie des dépôts, la limite de détection, l'intensité absolue et la reproductibilité du signal, la facilité de manipulation, la compatibilité avec différents systèmes de détection des signaux.

De façon générale, les principales qualités d'une lame nécessaires à l'immobilisation d'anticorps en vue de la fabrication d'une puce sont les suivantes :

- un fort taux de liaison à la molécule
- la capacité à conserver l'activité biologique de la protéine
- une faible variabilité entre les supports
- un ratio signal/bruit élevé

Les supports solides peuvent être des surfaces planes de verre, de polystyrène, ou de métal, ou des supports structurés comme les microcuvettes en verre ou en polymère. Les

supports solides plans tels que des lames de microscope (76 x 26 mm), sont utilisés pour la fabrication de biopuces. Le verre est un matériau rigide et de faible coût. Il peut être fonctionnalisé avec divers groupements chimiques permettant le couplage des sondes sur la surface, tels que des aldéhydes (Fodor, Read et al. 1991), des esters activés (Grubor, Shinar et al. 2004), des aminosilanes (Soultani-Vigneron, Dugas et al. 2005), des groupements époxy (Zhu, Klemic et al. 2000), des poly-L-lysines (Angenendt, Glokler et al. 2002) (Ruiz-Taylor, Martin et al. 2001). Les lames de verre peuvent aussi être modifiées avec du nickel, pour immobiliser des protéines possédant des étiquettes (tag) 6 histidines (Guschin, Yershov et al. 1997). Les lames de verre peuvent aussi être recouvertes d'une couche mince de métal comme l'or ou l'argent. L'or a une forte affinité pour les fonctions thiol. Des chaînes d'alkyl-thiols portant des groupements chimiques fonctionnels, peuvent être greffées sur un film d'or et former, dans certaines conditions, des couches autoassemblées ou SAMs (self assembled monolayers) sur la surface (Houseman, Huh et al. 2002). Les substrats en or sont des supports essentiels pour les biopuces utilisant la technique de détection par résonance des plasmons de surface (SPR) (Joos, Schrenk et al. 2000). D'autres types de modifications ont été effectués sur les lames de verre, telles que le recouvrement des surfaces par une couche de polymère comme le polyacrylamide, le PDMS (Polydimethyl-siloxane), l'agarose ou la gélatine, qui confèrent au support une structure poreuse. Les protéines sont piégées à l'intérieur d'une matrice de gel hydraté, permettant de conserver leur structure native et l'accessibilité à leurs sites actifs (Afanassiev, Hanemann et al. 2000; Arenkov, Kukhtin et al. 2000 ; Rubina, Dementieva et al. 2003). Des gels hydratés supramoléculaires récemment développés, semblent être très efficaces pour l'analyse des activités biologiques des protéines. Des poches aqueuses sont créées dans la matrice du gel où peuvent se dérouler les réactions biochimiques, et des espaces hydrophobes permettent de piéger les produits marqués des réactions (ex : produits fluorescents).

Enfin, des supports comme les surfaces en plastique (ex : le polystyrène), ont été utilisés pour l'immobilisation de protéines et de peptide par adsorption (Aina, Sroka et al. 2002). Ces différents types de supports peuvent être alors modifiés selon différentes chimies de surface de façon à contrôler l'état des sondes immobilisées (orientation, densité de greffage...).

2.2.2. *Puces en phase liquide*

La première utilisation de la cytométrie de flux pour l'analyse d'immunoessais utilisant des microsphères a été publiée en 1977 (Horan and Wheelless 1977). Un cytomètre de flux discrimine différentes particules par rapport à leur taille ou leur fluorescence, et permet donc d'effectuer des analyses multiplexées en utilisant différentes populations de microsphères. Les analyses multiplexées permettent d'effectuer de multiples analyses simultanées dans un seul tube, avec le même échantillon. L'utilisation de microsphères de différentes tailles a tout d'abord été proposée par Horan et al. (Horan and Wheelless 1977). Deux microsphères de taille distincte ont été utilisées pour la détection simultanée de deux anticorps différents par cytométrie de flux. Puis la méthode s'est étendue à quatre microsphères de taille différente pour détecter quatre anticorps. Mais la discrimination des microsphères par leur taille permet une détection simultanée de petit nombre d'analytes et l'incapacité de différencier les agrégats de petites microsphères des grosses microsphères limite sévèrement cette technique. Au contraire, l'utilisation de microsphères de taille identique mais de couleurs distinctes en proportions différentes résout le problème des agrégats et permet l'analyse simultanée d'un grand nombre de composés. Le multiplexage est alors possible grâce à un code couleur de chaque microsphère analysable par fluorescence (Morgan, Varro et al. 2004). Cette approche est réalisable pour l'analyse de plus de 100 analytes dans un échantillon complexe. Ces essais ont tout d'abord été développés par FlowMetrix avec la technologie xMAP (*Luminex multi-analyte profiling*) et ont ensuite été rapidement rivalisés par le système CBA (*cytometric bead array*) de chez BD Biosciences. Les microsphères peuvent être couplées à des molécules de captures contenant un groupement amine via leurs groupements carboxylates. Alternativement, des microsphères couplées à l'avidine peuvent être utilisées pour une liaison à des molécules de capture biotinylées. La surface des microsphères permet la liaison de $1-2 \cdot 10^6$ molécules par sphère. La petite taille des microsphères permet de les laisser en suspension pendant plusieurs heures, ce qui est suffisant pour l'immunoessai et l'analyse. Après le couplage des sphères aux anticorps de captures, les sphères peuvent toutes être mélangées pour réaliser l'immunoessai proprement dit. La détection se fera alors par un anticorps fluorescent qui permettra le dosage des analytes par une analyse en cytométrie de flux.

2.3. Les techniques de détection

Pour l'étape de détection, deux cas se distinguent :

- Méthode directe : l'antigène est marqué, généralement par un fluorophore dérivé de la cyanine, Cy3 ou Cy5, qui sont respectivement vert et rouge.
- Méthode indirecte : on procède à une deuxième étape consistant à utiliser un anticorps secondaire marqué, qui va, lui aussi, se fixer à l'antigène (Sanchez-Carbayo 2006).

Dans le cas de la méthode indirecte, la liaison de l'antigène, à la fois par l'anticorps de capture et par l'anticorps marqué (ou anticorps de détection), augmente la spécificité du test par comparaison à la méthode directe. En revanche, cette technique est plus difficile à développer car elle nécessite systématiquement la combinaison d'une paire d'anticorps pour chaque antigène étudié.

Les techniques actuelles de révélation des interactions anticorps-antigènes dans le cas des puces à anticorps sont classées en deux groupes (Cretich, Damin et al. 2006):

- Méthodes sans marquage utilisant la spectroscopie de masse, la résonance des plasmons de surface ("surface plasmon resonance", SPR) ou la microscopie à force atomique ("atomic force microscopy", AFM),
- Méthodes avec marquage mettant en oeuvre la fluorescence (méthode la plus utilisée), la chimiluminescence, l'électrochimiluminescence ou la radioactivité.

Les méthodes de détection et d'analyse des interactions entre les biomolécules sur puces doivent avoir certaines caractéristiques, comme une bonne résolution, une haute sensibilité, et une bonne reproductibilité dans les mesures effectuées.

2.3.1. Détection avec marquage

La méthode de détection de fluorescence est couramment utilisée sur puces car elle est simple à mettre en oeuvre, sensible, et permet d'effectuer des analyses à haute résolution. Son principe est basé sur le marquage par un fluorophore soit directement des biomolécules cibles, soit de biomolécules permettant de détecter indirectement l'interaction sonde-cible. Dans ce dernier cas, il s'agit le plus souvent d'un anticorps secondaire marqué et dirigé contre l'anticorps primaire correspondant à la cible recherchée. Les fluorophores sont des molécules qui absorbent l'énergie des photons issus d'une source de lumière (ex : laser), dans une gamme de longueur d'onde donnée (λ excitation). Ce phénomène provoque l'excitation des électrons des molécules et la restitution de l'énergie sous forme d'une lumière fluorescente, à

une longueur d'onde différente (λ émission). Certains facteurs peuvent influencer la fluorescence, comme le phénomène de « quenching » dû à l'interaction du fluorophore avec d'autres molécules fluorescentes présentes dans le milieu, et le phénomène de « photoblanchiment » ou photodécomposition dû à la destruction des molécules fluorescentes sous l'effet d'une forte intensité lumineuse. Plusieurs fluorophores sont actuellement utilisés pour le marquage et la détection des biomolécules sur puces, comme les cyanines (Cy3 et Cy5), la rhodamine, la fluoresceine. Cependant, cette technique comporte certaines limitations qui peuvent être liées : i) aux fluorophores (phénomènes de quenching et de photoblanchiment, et ii) à la nécessité de marquer les molécules cibles, ce qui risque de modifier leurs propriétés et leurs interactions avec les molécules sondes (Espina, Woodhouse et al. 2004; Cretich, Damin et al. 2006).

La méthode de détection par chimiluminescence sur puces est issue des techniques de détection utilisées en ELISA et Western blot. Dans le cas de la détection des interactions antigène/anticorps primaire, un anticorps secondaire lié à une enzyme comme la peroxydase du raifort ou la phosphatase alcaline est utilisé.

Pour finir, la radioactivité a également été utilisée pour le marquage des biomolécules par des isotopes tels que le ^{32}P , le ^3H , ou le ^{125}I . La détection du signal est effectuée par autoradiographie et quantifiée par un densitomètre (Falsey, Renil et al. 2001) (Ge 2000). L'avantage de cette technique est la quantification directe des biomolécules immobilisées sur la surface des puces. Cependant, les limitations de cette méthode sont liées surtout à des problèmes de sécurité et le temps de détection (> 10 h) (Espina, Woodhouse et al. 2004).

2.3.2. Détection sans marquage

La spectrométrie de masse SELDI-TOF (Surface Enhancement Laser Desorption/Ionization Time of Flight) est une technique de caractérisation qui peut être appliquée à l'analyse des biomolécules immobilisées sur puces. Ces molécules d'intérêt sont ionisées, et les ions sont libérés de la surface vers un détecteur où ils seront caractérisés selon leur rapport masse/charge (m/z) (Bischoff and Luidner 2004; Espina, Woodhouse et al. 2004).

Une autre approche consiste à utiliser la technique SPR ou résonance de plasmons de surface pour étudier en temps réel, les cinétiques d'interaction entre les biomolécules (Johnsson, Lofas et al. 1991 ; Ramachandran, Larson et al. 2005). C'est la méthode la plus utilisée pour la détection des interactions moléculaires sans marquage (ex : interaction antigène/anticorps, protéine/ADN...) (Ramachandran, Larson et al. 2005). Les supports sont

composés d'une couche mince de métal, le plus souvent l'or ou l'argent. Le principe est le suivant : lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique atteint une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchiée et l'autre partie est réfractée à travers la surface. Quand la lumière passe d'un milieu d'indice de réfraction élevé vers un milieu d'indice plus bas, la réflexion peut être totale, et un composant de la lumière, l'onde évanescente se propage perpendiculairement à la surface. Si une fine couche de métal, riche en électrons libres, de l'or ou de l'argent, est déposée à l'interface, ces électrons entrent en résonance avec les photons de cette onde évanescente, ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface (Fig. 18). Cette résonance se traduit au niveau du faisceau réfléchi par une chute de l'intensité à un angle de réflexion minimum. Cet angle est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent (Homola 2008; Piliarik and Homola 2009). Ainsi, lorsqu'une interaction se produit entre des biomolécules sondes immobilisées sur le support et des cibles, il y a une perturbation locale de l'indice du milieu diélectrique donc un changement de l'angle de réflexion du faisceau incident. La méthode de mesure consiste à suivre, pour un angle d'incidence et une longueur d'onde fixés, les variations de la réflectivité dues au déplacement du pic d'absorption de la SPR. La résonance de plasmons de surface est une technique permettant l'étude des interactions entre protéines dans une gamme étendue de masses moléculaires (Davis and Wilson 2000), allant jusqu'aux cellules entières (Quinn, O'Neill et al. 2000).

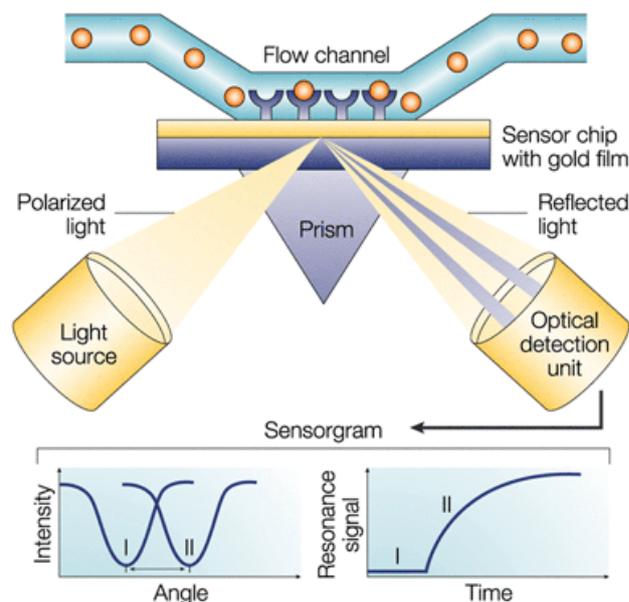


Figure 18 : Principe du système de résonance plasmonique de surface (Cooper 2002).

2.4. Fonctionnalisation des puces

Plusieurs stratégies existent pour immobiliser des anticorps sur un support. Dans le cas des puces à anticorps, la littérature fournit de nombreux exemples : adsorption, liaison aux groupes thiols ou amines, etc (Kusnezow, Jacob et al. 2003). Bien que les anticorps présentent un risque de dénaturation moindre par rapport à d'autres protéines, le challenge de cette étape de fabrication réside dans la conservation de l'état natif de l'anticorps et donc de sa capacité de liaison. Bien souvent, les liaisons covalentes présentent ce risque, mais elles permettent toutefois d'assurer une fixation optimale, et surtout de meilleures performances en terme de reproductibilité (Seurnyck-Servoss, White et al. 2007). Les différentes stratégies d'immobilisation des protéines sur des supports dépendent du type d'interactions possibles entre la protéine et la surface de la puce. Des interactions directes ou indirectes peuvent s'établir entre la protéine et le support. Les liaisons directes s'effectuent par adsorption physique, ou greffage covalent sur la surface, ou par piégeage de la protéine à l'intérieur d'une structure poreuse. Les liaisons indirectes s'établissent par affinité entre une molécule couplée à la protéine et une autre molécule immobilisée sur le support.

2.4.1. Immobilisation aléatoire par adsorption

L'adsorption physique est le type d'immobilisation le plus simple, puisqu'elle nécessite uniquement le contact entre l'anticorps et le support d'immobilisation. La liaison entre les deux espèces peut résulter d'interactions entre groupements polaires qui forment des liaisons hydrogènes entre eux (c'est le cas des groupements $-OH$, $-NH_2$, $=O$ et $=NH$), mais aussi d'interactions de type hydrophobe (Bilitewski 2006). Les interactions hydrophobes à l'origine de l'adsorption passive présentent le risque de bloquer le(s) site(s) de liaison entre l'anticorps et l'antigène (Brillhart and Ngo 1991) (Fig. 19). De plus, l'orientation des protéines par adsorption physique à la surface de la puce est aléatoire et les adsorptions non spécifiques sont élevées, ceci peut limiter la sensibilité des tests effectués sur ces puces.

Ce type d'immobilisation peut être réalisé sur plusieurs types de support :

- Le verre présente de nombreux avantages : il est peu onéreux, inerte, non polaire, mécaniquement stable et transparent. Par ailleurs, ce matériau est facile à manipuler pour la fonctionnalisation de la surface, la fabrication en elle-même de la puce, et l'analyse du test (Kusnezow, Jacob et al. 2003)

- Les membranes en nitrocellulose permettent l'immobilisation d'approximativement 100µg de protéine par cm². De plus, ce type de matrice présente une biocompatibilité vis-à-vis des protéines immobilisées, dans la mesure où celles-ci peuvent maintenir leur activité au cours du temps. Néanmoins, ces membranes possèdent une fluorescence intrinsèque et une capacité de diffusion de la lumière non négligeable (Bilitewski 2006).
- Le polystyrène est un polymère hydrophobe très utilisé pour les tests en plaques multi puits. L'adsorption passive de biomolécules de type anticorps sur ce type de support se fait *via* des interactions hydrophobes et ioniques.
- Les gels en polyacrylamide ont l'avantage de présenter une faible fluorescence intrinsèque, une faible capacité d'absorption non spécifique et un pouvoir élevé de fixation des molécules à immobiliser. En revanche, la porosité limitée de ces gels retarde la diffusion des molécules à analyser, ces dernières devant interagir avec les composés immobilisés (Arenkov, Kukhtin et al. 2000).

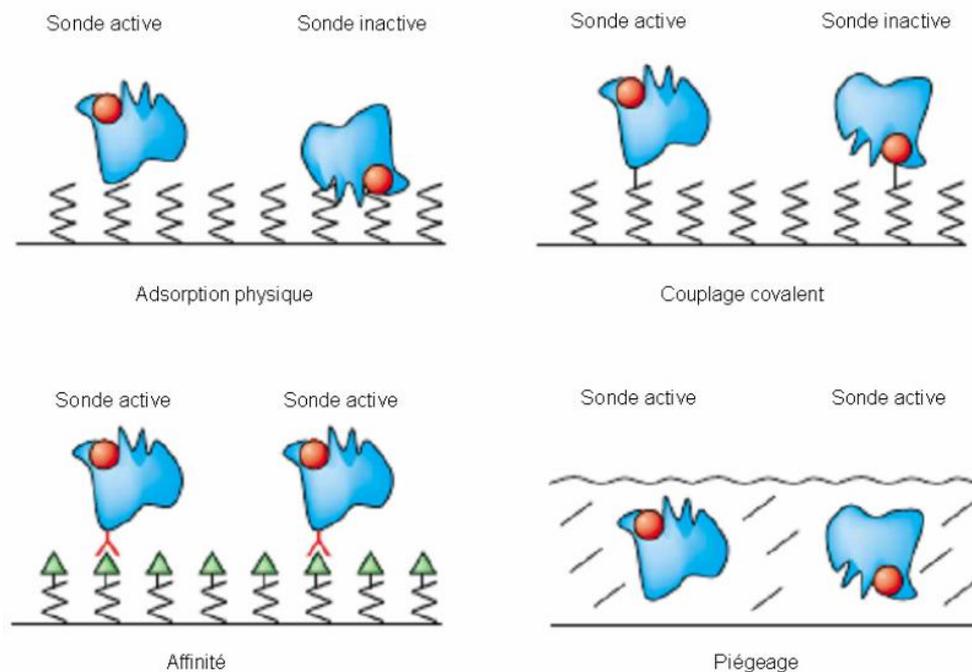


Figure 19 : Différentes méthodes d'immobilisation des protéines. L'immobilisation non orientée des sondes à la surface peut altérer la conformation native des protéines, diminuer leur activité biologique ou les rendre inaccessibles à leurs cibles ou analytes (en rouge). Les sondes sont alors dans un état inactif (Zhu and Snyder 2003).

2.4.2. L'immobilisation orientée

D'une manière générale, l'immobilisation des anticorps est conditionnée par la nécessité de favoriser la liaison avec l'antigène. On parle d'immobilisation orientée lorsque les anticorps sont fixés par l'extrémité opposée aux fragments Fab, c'est-à-dire le fragment Fc. L'immobilisation orientée de protéines sur un support est une stratégie plus délicate à mettre en œuvre, mais aussi plus efficace. Elle permet d'augmenter la densité surfacique de sondes présentant des sites actifs accessibles sur la biopuce (Fig. 19). Pour faciliter l'accessibilité des molécules cibles aux sites actifs des protéines immobilisées, les groupements réactifs de la surface sont portés par des bras $(-CH_2)_n$ espaceurs bifonctionnels afin d'éloigner les protéines de la surface (Kusnezow, Jacob et al. 2003). La stratégie d'immobilisation par affinité permet d'assurer une fixation sélective indirecte des sondes *via* des interactions biologiques spécifiques. Le premier exemple qui peut être cité est celui du système biotine/streptavidine. La biotine et la streptavidine possèdent une grande affinité l'une envers l'autre ($K_d \sim 4 \times 10^{-14}$ M) (Green 1975; Green 1990), et ceci est exploité pour immobiliser des anticorps : la streptavidine qui est une protéine comportant quatre sites spécifiques disponibles pour se lier à une molécule de biotine est directement fixée au support et sert de point d'ancrage à l'anticorps biotinylé (Peluso, Wilson et al. 2003). L'anticorps peut être couplé à la biotine et ainsi immobilisé sur cette surface fonctionnalisée avec de la streptavidine (Ruiz-Taylor, Martin et al. 2001; Peluso, Wilson et al. 2003). Ce mode de fixation indirecte des sondes permet de diminuer l'adsorption non spécifique des protéines sur le support. Toutefois, dans la majorité des approches, il ne permet pas d'orienter les protéines sur la surface car la fixation de la biotine sur la protéine s'effectue de façon aléatoire sur la protéine au niveau des groupements amine.

Une deuxième approche consiste en l'utilisation des protéines A et G, qui sont des protéines membranaires extraites respectivement des germes *Staphylococcus aureus* et des streptocoques des groupes G et C. Elles ont la particularité de se lier spécifiquement, et avec une grande affinité, aux fragments Fc des IgG. Dans les années 70, ces protéines ont rapidement montré un grand intérêt dans la purification et l'analyse des immunoglobulines, mais également dans la séparation des différentes sous classes (IgA, IgM, etc...) (Goding 1978). Leur spécificité de liaison pour le fragment Fc en fait des intermédiaires intéressants pour la fabrication de puces à anticorps.

D'autres techniques d'immobilisation par affinité ont été développées, comme celle utilisant des protéines recombinantes contenant une séquence poly-histidine qui permet

d'immobiliser les protéines sur un support de Ni/NTA (nickel (II) / N nitrilotriacétate). Ce complexe présente une forte affinité pour les noyaux imidazoles de l'histidine. De même, la production de protéines de fusion contenant une séquence GST (glutathion S-transférase), permet de les immobiliser sur des lames de verre fonctionnalisées avec le glutathion (Guschin, Yershov et al. 1997).

2.4.3. *Couplage covalent*

Le greffage covalent d'un anticorps, qui est par conséquent issu d'une réaction chimique, permet d'obtenir des conjugués protéine/support (en général des polymères) stables et utilisables en diagnostic. En effet, la liaison covalente est une technique d'immobilisation des anticorps très robuste (Cretich, Damin et al. 2006). Néanmoins, toute modification chimique d'une protéine peut conduire à une altération de son intégrité, et donc à des pertes d'activité biologique. Dans le cas des anticorps, la perte d'activité biologique modifie la capacité de liaison à l'antigène. Plusieurs phénomènes, décrits par Peluso *et al.*, 2003 (Peluso, Wilson et al. 2003), sont en cause:

- la modification chimique du site de liaison à l'antigène (situé dans les zones hypervariables des fragments Fab) ;
- l'encombrement stérique provoqué par le support lui-même ;
- l'encombrement stérique provoqué par la promiscuité des anticorps immobilisés ;
- la dénaturation due aux multiples sites d'attachement.

Pour éviter ce problème de perte d'activité, les réactions chimiques impliquées dans le greffage doivent avoir lieu à des positions prédéfinies sur l'anticorps, dans des sites qui ne sont pas impliqués dans les processus de reconnaissance entre anticorps et antigène. On parle alors de régio-sélectivité qui se contrôle en utilisant des réactions chimio-sélectives entre le support et une fonction particulière portée par l'anticorps, par exemple les thiols de la région charnière, ou encore les groupements amine, carbonyle ou acide carboxylique des résidus oligosaccharidiques.

2.4.4. *Avantages et limitations*

Si on les compare aux divers formats d'immunoessais en phase solide décrits précédemment, les puces à anticorps constituent une technologie prometteuse dans le domaine du diagnostic et plus généralement dans l'étude des marqueurs biologiques (ou

biomarqueurs). En effet, grâce à ces outils innovants, on peut désormais envisager le criblage à haut débit des protéines impliquées dans les pathologies, en consommant de moins en moins de produit, tout en gardant une sensibilité et une spécificité très satisfaisantes. Bien que leur utilité ne soit plus à démontrer, il faut néanmoins noter quelques limites de ces dispositifs. La conception des puces à protéines, et plus particulièrement des puces à anticorps, constitue un défi technologique. L'efficacité de ces dispositifs n'est garantie que si les molécules immobilisées sont intactes. Il est donc important de maintenir la structure native des protéines, ceci entre autres, grâce à un niveau d'hydratation suffisant. Par ailleurs, l'un des problèmes majeurs de conception des puces à anticorps est la sélection des protéines à haute affinité : il est important de valider la spécificité des anticorps monoclonaux destinés à ces fins. En général ceci peut être mené en couplant la méthode du Western Blot et la spectrométrie de masse pour identifier une entité de masse moléculaire précise. Par ailleurs, la linéarité de la méthode de détection de l'antigène doit être vérifiée en incluant des essais de dilution (Sanchez-Carbayo 2006).

3. L'immuno enrichissement pour la détection de cellules tumorales circulantes

Avant de former des métastases, des cellules tumorales dites « circulantes » quittent le foyer tumoral d'origine et envahissent progressivement l'organisme. Grâce à des progrès technologiques récents, les Cellules Tumorales Circulantes (CTC) font l'objet actuellement d'une recherche importante en oncologie pour définir leur intérêt diagnostique, pronostique et prédictif de réponse aux traitements. L'intérêt est également croissant sur les informations qu'elles peuvent fournir sur les caractéristiques biologiques de la tumeur.

3.1. Historique

En clinique, l'étude du processus métastatique a longtemps reposé sur les deux situations extrêmes de ce processus, à savoir la tumeur initiale et les métastases. Il s'agissait généralement d'étudier quelles particularités (génétiques ou autres) définissaient les cellules métastatiques et si la présence de ces caractéristiques dans la tumeur initiale constituait un marqueur pronostique de rechute métastatique. Plus récemment, deux nouvelles fenêtres d'étude du processus métastatique se sont développées techniquement depuis une dizaine

d'année : une fenêtre « post-intravasation » avec la détection et l'étude des CTC (*Circulating Tumor Cells*) dans le sang (Cristofanilli and Mendelsohn 2006), et une fenêtre « post-dissémination » avec la détection et l'étude des DTC (*Disseminated Tumor Cells*) dans la moelle osseuse (Braun, Vogl et al. 2007). Ces deux types de cellules tumorales correspondent à des étapes différentes du processus métastatique et n'ont vraisemblablement pas la même signification clinique. En l'absence d'un marqueur de clonalité fiable dans les cancers du sein, il est probable que le type de détection utilisé (pour les CTC ou les DTC) a une influence majeure sur la nature des résultats et leurs éventuelles applications cliniques concrètes que l'on peut en attendre. Dans ce manuscrit, nous aborderons uniquement les CTC.

3.2. Méthodes de détection

La concentration « réelle » en CTC du sang périphérique est inconnue, des variations d'environ 1 à 10.000 étant rapportées, à un même stade clinique (cancer localisé ou métastatique), par les différentes techniques de détection. Les CTC correspondent à une infime minorité des éléments figurés du sang, et ont probablement une concentration inférieure à 0,1 cellule par mm^3 , soit moins d'une cellule pour 100.000 cellules mononucléées sanguines (CMNS), concentration très inférieure au seuil de détection des techniques de type cytométrie en flux. Leur détection doit donc faire appel à des techniques hautement sensibles (peu de CTC) et encore plus hautement spécifiques (beaucoup de CMNS).

3.2.1. Enrichissement

Une première étape d'enrichissement du prélèvement sanguin peut consister en une centrifugation sur gradient de Ficoll, de manière à séparer (par différence de densité) les CMNS des globules rouges et plaquettes. Les CTC ayant une densité similaire aux CMNS, elles sont présentes au niveau de l'anneau leucocytaire qui est récupéré après centrifugation. Une deuxième étape d'enrichissement peut reposer sur l'expression différentielle d'un antigène de membrane entre CTC et CMNS. Si l'on prend l'image théorique de la colonne d'affinité, une immunosélection positive consiste à capturer avec des anticorps les CTC et éluer les CMNS, l'inverse étant une immunosélection négative (Ring, Smith et al. 2004). Les CMNS expriment des antigènes de surface relativement bien définis (par exemple, CD45, antigène pan-leucocytaire présent à la surface de la quasi totalité des CMNS) mais les approches d'immunosélection négative ont été généralement abandonnées du fait d'un

enrichissement en CTC considéré comme insuffisant. L'immunosélection positive, largement utilisée, repose quant à elle sur la présence d'antigènes spécifiques à la surface des CTC non exprimés par les CMNS (par exemple, la protéine membranaire épithéliale EpCAM, *Epithelial Cell Adhesion Molecule*). Le choix du marqueur membranaire utilisé pour l'immunosélection est déterminant et varie selon le type de cancer à étudier. L'efficacité de l'immuno-enrichissement magnétique (utilisant un anticorps adapté) a été validée dans plusieurs types de tumeurs épithéliales, dont les cancers du sein. Une variante intéressante de l'étape d'immuno-enrichissement des CTC utilise les techniques de « puces microfluidiques ». Schématiquement, ces puces comportent un circuit de très faible diamètre au sein duquel les fluides (en l'occurrence le sang) vont s'écouler de manière laminaire. Grâce au diamètre particulièrement réduit de ces conduits, la fréquence et la durée d'interaction entre les anticorps, disposés sur les parois du circuit et les CTC augmentent, permettant ainsi d'augmenter la probabilité de liaison des CTC, et donc la sensibilité générale de la technique. Une troisième méthode d'enrichissement repose sur le fait que les CTC sont plus volumineuses que les autres CMNS, et peuvent donc être retenues par des filtres adaptés. Il existe là aussi plusieurs techniques, utilisant des filtres du commerce (Wong, Kahn et al. 2006) ou spécialement brevetés à cette fin (Metagenex®)(Vona, Sabile et al. 2000). La figure 20 présente schématiquement les principales techniques d'enrichissement des CTC.

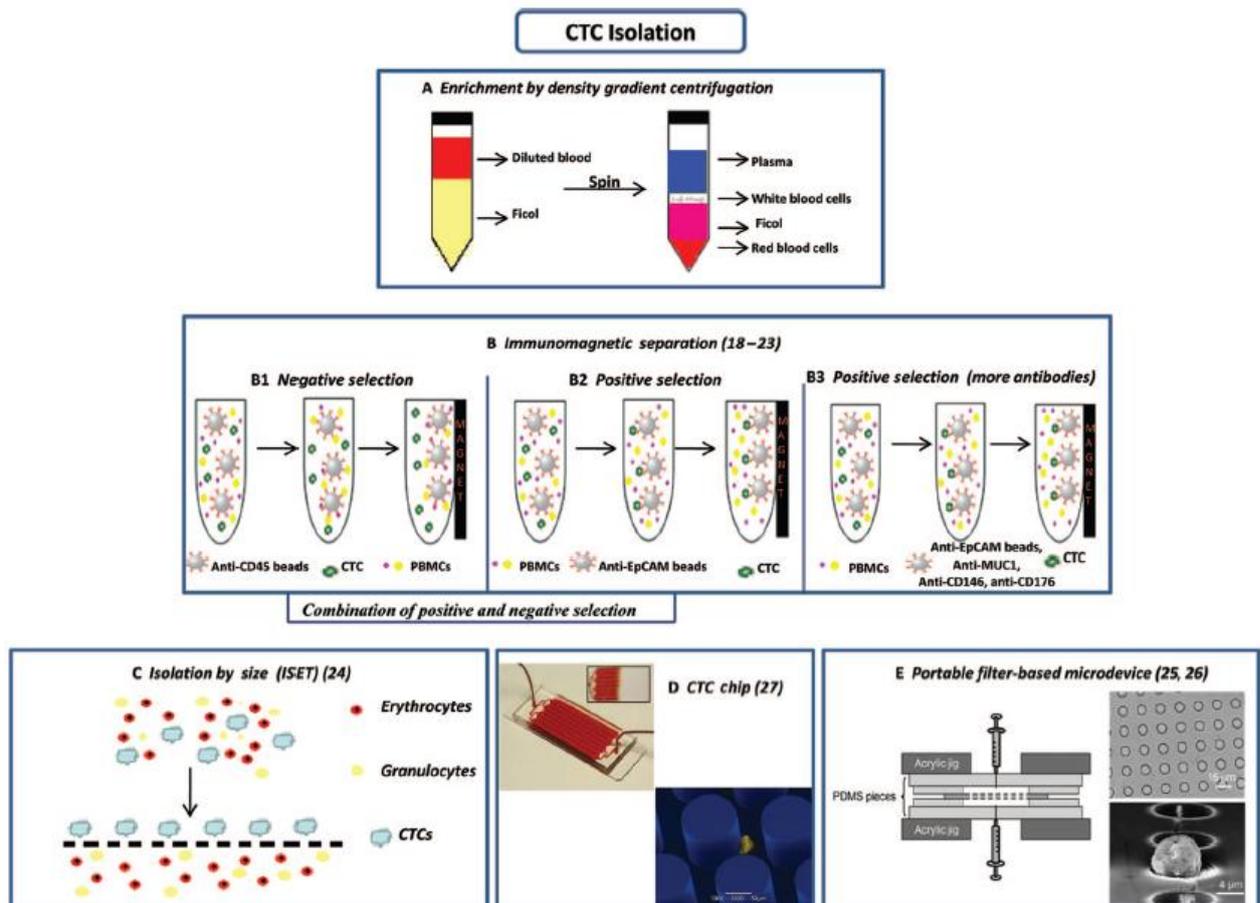


Figure 20 : Principales approches pour l’enrichissement des CTC (Lianidou and Markou 2011). A) L’enrichissement par gradient de densité en Ficoll. B) Séparation immunomagnétique. B1) Sélection négative en éliminant les leucocytes grâce à l’anticorps anti CD45. B2) Sélection positive grâce à un anticorps anti EpCam. B3) Utilisation combinée d’anticorps dirigés contre des marqueurs de surface des CTC (CD46, CD176, CK19...). C) Système ISET. D) Système microfluidique : la puce capture les cellules du sang exprimant EpCam par l’utilisation d’un anticorps anti EpCam immobilisé sur la puce. E) Système de filtration basé sur la différence de taille entre les CTCs et les cellules sanguines.

3.2.2. Détection

Après la/les étape(s) d’enrichissement précédentes (parfois non utilisées), la détection des CTC parmi les CMNS restantes peut se faire par biologie moléculaire ou techniques de marquage cytologique, deux approches différentes conduisant à des résultats qui ne sont pas toujours exactement concordants (Lambrechts, Bosma et al. 1999 ; Smith, Slade et al. 2000) (Fig. 21).

Les techniques de biologie moléculaire (RT-PCR) reposent sur la détection de séquences d'ARNm qui seraient présentes dans les CTC et absentes dans les CMNS, moyennant la définition préalable de seuils de positivité (de Cremoux, Extra et al. 2000 ; Bosma, Weigelt et al. 2002). Les transcrits amplifiés sont donc choisis pour être exprimés dans les cellules épithéliales et/ou les cellules mammaires transformées, comme la cytokératine 19 (CK19), la mucine 1 (MUC1), l'*Epithelial Cell Adhesion molecule* (EpCAM), la mammaglobine, HER2, ou encore la télomérase (Soria, Gauthier et al. 1999). Les marqueurs les plus utilisés sont MUC1 et CK19 (Pierga, Bidard et al. 2007 ; Iakovlev, Goswami et al. 2008). La détection peut être réalisée de manière quantitative (RT-qPCR), si l'on n'amplifie qu'un seul gène à la fois. L'autre possibilité est de réaliser une *multiplex-PCR* en amplifiant simultanément plusieurs transcrits d'intérêts grâce à un mélange d'amorces de PCR. L'avantage est alors de détecter plusieurs marqueurs simultanément, mais sacrifie l'aspect quantitatif, l'amplification ne se réalisant pas uniquement de manière linéaire pour chacun des ADNc obtenus. Un intérêt de ces techniques moléculaires est qu'elles reposent sur un matériel congelable (ARNm puis ADNc après transcription inverse) et donc facilement analysable *a posteriori*. De plus, la sensibilité des techniques de biologie moléculaire est très élevée et unanimement reconnue. Cependant, ces techniques se heurtent à un biais non négligeable de leur spécificité dès lors que la détection repose sur des transcrits épithéliaux ou mammaires, qui sont souvent exprimés par des cellules non tumorales, que ce soit de manière légitime (cellules circulantes non tumorales exprimant le gène cible) ou illégitime (progéniteurs hématopoïétiques, voire même CMNS) (Kowalewska, Chechlinska et al. 2006).

Les autres techniques de détection sont cytologiques. La détection des CTC parmi les CMNS restantes après enrichissement initial repose alors sur un immunomarquage des CTC. Ce marquage cible logiquement les mêmes marqueurs épithéliaux et/ou mammaire (tels que CK19, EpCAM, *etc*). Un marquage simultané de plusieurs cibles peut être obtenu en utilisant des anticorps primaires couplés à des fluorochromes différents. Ces techniques se caractérisent généralement par une plus grande spécificité que les techniques de biologie moléculaire : les cellules sont vues, permettant d'écarter des CMNS sur des critères morphologiques ou d'immunomarquage (par exemple, expression de l'antigène pan-leucocytaire CD45). L'amélioration de la sensibilité des techniques morphologiques est par ailleurs l'objet des principales avancées dans le domaine.

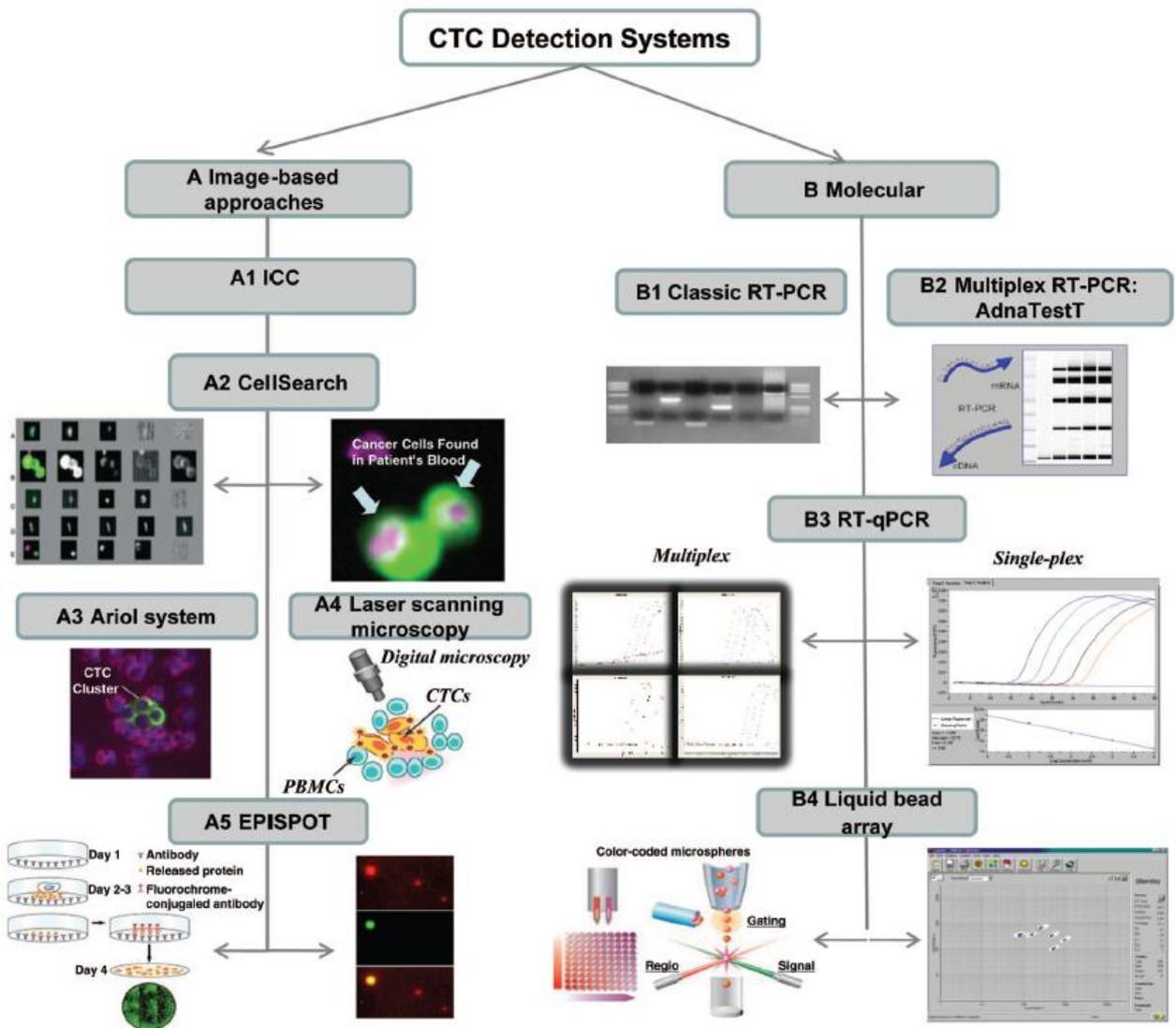


Figure 21 : Principales approches pour la détection des CTCs et leur caractérisation moléculaire (Lianidou and Markou 2011). A) Approches basées sur les images; A1) immunocytochimie classique. A2) Système CellSearch. A3) Système Ariol. A4) Laser scanning cytométrie. A5) EPISPOT (détecte les protéines tumorales relarguées par les CTCs). B) Tests moléculaires, basés sur l'analyse des acides nucléiques des CTCs. B1) RT-PCR classique. B2) RT-PCR multiplexée (Adnatest Breastcancer). B3) RT-qPCR; B4) puce en phase liquide.

3.2.3. Système industriel

La plupart des systèmes de détection des CTC sont issus de la recherche académique et plusieurs de ces techniques devraient connaître prochainement un développement

industriel. Pour l'instant, seuls trois systèmes ont été développés par l'industrie : deux systèmes (Adnagen®, Metagenex®) sont actuellement à un stade clinique expérimental, alors que l'utilisation du troisième système Cellsearch (Veridex®) a été validée aux USA dans plusieurs indications.

La technique développée par Adnagen® (Zieglschmid, Hollmann et al. 2005) comporte tout d'abord une séparation immunomagnétique non automatisée reposant sur des billes magnétiques couplées à un mélange de plusieurs anticorps différents (et variant d'après le type de cancer recherché). Les ARNm sont ensuite extraits, avant transcription inverse. Une PCR multiplex est alors réalisée en amplifiant dans une même réaction plusieurs séquences correspondant à des gènes d'intérêt différents. Ces gènes sont pour certains des gènes épithéliaux mammaires censés être exprimés par toutes les CTC et donc refléter la charge tumorale (MUC1...), d'autres sont des gènes « cibles », potentiellement non exprimés par tout ou partie des CTC (famille HER, récepteurs hormonaux...). Les résultats sont rendus sous forme qualitative (résultat positif ou négatif), sans nombre de CTC/ml. Les intérêts de cette technique sont qu'elle permet de détecter la transcription d'à peu près n'importe quel gène cible, et que la détection des CTC ne repose pas sur l'expression d'une cible unique possiblement labile (plusieurs anticorps pour l'immunosélection, plusieurs amorces).

La technique ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*) de Metagenex® est une technique « ouverte » qui permet une caractérisation à la fois morphologique, immunocytologique et moléculaire des CTC (Vona, Sabile et al. 2000). Il s'agit d'un enrichissement par filtration des cellules du sang sur une membrane microporeuse (pores cylindriques de 8 microns) laissant passer la plupart des CMNS et permettant de retenir les CTC. Une fois les CTC ainsi isolées, les techniques ultérieures sont laissées à discrétion des laboratoires. Il peut s'agir d'un décompte optique des CTC (permettant de vérifier l'existence des anomalies cytologiques propres aux cellules tumorales) par immunocytomarquage, d'une microdissection laser des CTC et extraction de l'ARN ou de l'ADN pour recherche des altérations moléculaires cellulaires (mutations, variations d'expression, etc).

La technique CellSearch de Veridex® est une technique cytologique automatisée (Allard, Matera et al. 2004). Le sang périphérique est prélevé dans un tube dédié de 7,5ml (tubes CellSave), pouvant être conservé à température ambiante pendant 4 jours avant analyse et permettant le transport vers un laboratoire d'analyse référent. Après centrifugation, un enrichissement immunomagnétique sélectionne les cellules sur l'expression de la molécule EpCAM. Les cellules ainsi isolées sont détectées en fluorescence, après marquage nucléaire (DAPI, fluorescence bleue) et immunomarquage des cytokératine 8, 18 et 19 (fluorescence

verte) et de l'antigène pan-leucocytaire CD45 (fluorescence rouge). Les corps fluorescents sont ensuite analysés un à un et un logiciel de reconnaissance d'image permet d'isoler les CTC sur une conjonction de plusieurs critères : une CTC doit avoir une morphologie ronde et une taille adaptée et un noyau (DAPI) entouré par du cytoplasme CK+ et ne pas exprimer l'antigène CD45. Un quatrième canal de fluorescence est utilisable, permettant de détecter l'expression de certaines protéines d'intérêt, comme HER2 ou EGFR. Les résultats sont exprimés en nombre de CTC/7,5ml. Cette technique est actuellement la seule à permettre une analyse reproductible des CTC (Riethdorf, Fritsche et al. 2007) dans de vastes cohortes sans nécessiter l'intervention d'experts en cytologie. L'utilisation en routine clinique du système CellSearch a ainsi été validée par la FDA dans les cancers du sein, du côlon et de la prostate hormono-résistant, compte-tenu des résultats cliniques obtenus jusqu'à présent.

3.3. Conclusions

Les perspectives d'utilisation des CTC sont nombreuses dans le cancer du sein, mais aussi dans d'autres types de cancers. D'un point de vue diagnostique, il s'agirait de permettre éventuellement le diagnostic de maladies tumorales dès lors qu'elles ont atteint un stade invasif. Cette approche, encore non développée, demande des techniques hautement sensibles (pour limiter les faux négatifs, même à un stade localisé peu invasif de la maladie) et si possible spécifique (pour limiter les faux positifs), reposant sur une analyse visuelle morphologique des CTC. Plus simplement, il peut s'agir de l'affirmation d'une rechute métastatique lors du suivi en situation adjuvante, face à une potentielle localisation secondaire difficile à biopsier ou face à une augmentation isolée de marqueurs sériques. En situation diagnostique, les éléments strictement anatomopathologiques de type grade histopronostique pourraient par ailleurs être remplacés par les signatures de grade génomique (Loi, Haibe-Kains et al. 2007), appliquées aux CTC. Il n'existe pour l'instant aucune étude publiée dans ces domaines.

4. La découverte de nouveaux biomarqueurs tumoraux

4.1. Définition d'un biomarqueur tumoral

Un biomarqueur tumoral est une substance que l'on dose dans le sang (parfois aussi dans des structures à explorer comme pour le liquide pleural, voire dans les urines), et qui correspond à la présence ou au développement d'une tumeur maligne. Une définition des biomarqueurs (condensé de « marqueurs biologiques ») a été donnée par la FDA en 2004 et stipule qu'un biomarqueur est une caractéristique qui peut être mesurée objectivement comme indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus pathologique ou comme réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique.

Parmi les biomarqueurs, les marqueurs biologiques moléculaires sont les plus prometteurs car ils bénéficient des innovations technologiques en génomique (Ramaswamy and Perou 2003), protéomique (Schulte, Tammen et al. 2005) et métabolomique (Ferne, Trethewey et al. 2004). Ils peuvent être classés en quatre grandes catégories :

- L'ADN : la cartographie du génome humain a servi de base au développement de plusieurs types d'analyses : les prédispositions génétiques, les mutations génétiques et l'analyse des *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP).
- L'ARN : son hybridation sur puce à ADN permet une analyse comparative par rapport à un profil sain du transcriptome.
- Les protéines : leur utilisation est applicable tout au long d'un processus de recherche et développement et permet à un instant donné de visualiser l'ensemble des éléments fonctionnels.
- Les "petites molécules" : elles regroupent les métabolites, les hormones, ainsi que toute autre molécule organique et inorganique présente dans l'organisme humain.

Les biomarqueurs reflètent un état physiologique de la cellule à un moment spécifique, c'est la signature moléculaire. Des peptides et des protéines sont actuellement utilisés en tant que biomarqueurs, comme par exemple le PSA (*Prostate Specific Antigen*) dans le cas du cancer de la prostate, l'insuline et le peptide-C dans le diabète, des fragments de collagène pour l'ostéoporose, les peptides β amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, la résistine dans l'obésité,...

Le plasma reste la matrice biologique de choix pour la mesure de biomarqueurs, en tant que milieu physiologique circulant représentatif de la composition des tissus et de processus

pathologiques. Les biomarqueurs peuvent être des protéines excrétées, ils peuvent être également soit d'origine transmembranaire puis tronqués comme l'ACE soit d'origine intracellulaire puis clivés, comme la protéine DMBT (*Deleted in Malignant Brain Tumors*).

4.2. Qualité d'un biomarqueur

Les qualités théoriques d'un biomarqueur tumoral idéal sont :

- Ce doit être une molécule synthétisée par la tumeur, différente des molécules produites par les tissus sains, son taux doit être indétectable chez le sujet normal
- Il doit être uniquement libéré par les cellules cancéreuses d'une tumeur spécifique
- Il doit être relargué par la tumeur dans un milieu accessible (sérum, urine)
- Sa concentration doit refléter la masse tumorale, au long de l'évolution
- Elle doit être détectable à de très faibles concentrations
- Le test ne doit donner ni faux positifs ni faux négatifs

Mais, il faut bien se rendre à l'évidence que le biomarqueur tumoral idéal n'existe pas. En pratique, seulement 2 de ces qualités sont pour l'instant vérifiées :

- Le biomarqueur doit être relargué par la tumeur dans un milieu accessible
- Sa concentration doit refléter la masse tumorale, au long de l'évolution

Un biomarqueur tumoral idéal devrait permettre le dépistage, le suivi et un meilleur traitement et pour cela être sensible et spécifique. La sensibilité est définie par la proportion de malades porteurs d'une tumeur ayant le marqueur élevé. Elle nécessite un dosage très fin, une sécrétion détectable pour une tumeur et une absence de faux négatifs. La spécificité est définie par la proportion de bien portants qui ont une valeur normale du marqueur. Elle nécessite une synthèse seulement par les cellules cancéreuses et une absence de faux positifs. La spécificité peut être vue à plusieurs niveaux : de la maladie cancéreuse (diagnostic bénin malin), d'un organe (localisation de la tumeur primitive), d'une localisation métastatique. Cependant, si le marqueur est très spécifique d'un organe, comme par exemple le PSA, son utilisation pour le dépistage peut devenir intéressante : en effet, l'augmentation des taux pourra être en rapport avec une autre pathologie prostatique, mais permettra de commencer des examens complémentaires à bon escient. Même un marqueur très sensible (90%) et très spécifique (90%) ne permet pas en effet une détection efficace. Supposons un cancer très fréquent (1/1000 personnes), sur 1000 personnes testées, 100 auront un marqueur positif : 99 auront des examens (biopsies) inutiles.

4.3. Validation d'un biomarqueur

Un biomarqueur, à l'image d'un médicament, suit un certain nombre d'étapes pour être considéré comme validé (Fig. 22). Rifai et *al.* ont récemment décrit un processus complet et détaillé de la validation de biomarqueurs à travers six étapes successives (Rifai, Gillette et al. 2006): découverte, qualification, vérification, optimisation, validation clinique et commercialisation. De la découverte à la validation de biomarqueurs protéiques, trois obstacles majeurs doivent être surmontés : tout d'abord, la complexité et la gamme dynamique étendue des protéines plasmatiques et des autres fluides biologiques, ensuite, la très faible concentration présumée de nombreux biomarqueurs spécifiques de maladies, et enfin la variabilité des individus et des pathologies. Aujourd'hui, aucune technique analytique utilisée seule n'a la capacité de surmonter ces trois obstacles simultanément, c'est pourquoi un tel processus de validation a été présenté, étape par étape, en combinaison avec des approches expérimentales et des outils analytiques adaptés à chaque phase du développement. La première étape de découverte vise à identifier les biomarqueurs potentiels, par analyse différentielle semi quantitative entre différents états (basiquement sain versus malade). Cette étape est effectuée à partir de tout type de milieux biologiques et elle utilise un nombre réduit d'échantillons. Il en résulte une liste de plusieurs milliers de protéines, qui nécessitent une réévaluation pour prouver qu'elles présentent bien une différence d'expression suivant différents états. Du fait du nombre de ces faux positifs et de la sensibilité des techniques d'identification parfois insuffisante, cette liste de biomarqueurs potentiels est souvent enrichie de protéines de la littérature ou d'autres approches comme le transcriptome.

Les étapes de validation qui succèdent à la première identification sont des approches ciblées et quantitatives, permettant d'utiliser des méthodes analytiques spécifiques et sensibles. Après l'étape d'identification, la qualification sert, d'une part, à confirmer les différences d'expression des protéines identifiées avec une autre méthode analytique, et, d'autre part, à vérifier que cette expression différentielle se retrouve dans le fluide biologique où sera développé le test final (la plupart du temps dans le plasma) dans le cas où l'identification a nécessité l'utilisation d'un autre milieu biologique.

Dans l'étape de « vérification », l'analyse est étendue à un plus grand nombre d'échantillons plasmatiques, et prend en compte des critères environnementaux, génétiques et biologiques pour grouper les échantillons. Ainsi, à travers cette étape de vérification, la sensibilité du candidat biomarqueur est confirmée (la capacité du test à être positif pour un

échantillon malade), et sa spécificité commence à être évaluée (la capacité du test à être négatif pour un échantillon sain).

	Phase de développement	Echantillons	Technique analytique	Nombre d'analytes	Nombre d'échantillons
Semiquantitatif	Découverte : Identification de candidats biomarqueurs	Fluides proximaux Surnageant de lignées cellulaires Plasma d'animaux modèles Plasma Humain ("Gold Standard") (variabilité biologique réduite)	Elimination des protéines majoritaires Fractionnement poussé LC-MS/MS (bas débit)	1 000	10
	Qualification : Abondance différentielle des candidats dans le plasma humain confirmée	Plasma Humain ("Gold Standard") (variabilité biologique réduite)	Elimination des protéines majoritaires Fractionnement +/- immunoconcentration SID-MRM-LC-MS/MS (bas-moyen débit, multiplexage)	30-100	10
Ciblé : quantitatif	Vérification : Début de l'évaluation de la spécificité des candidats	Plasma humain représentatif d'une population (variabilité biologique normale)	Elimination des protéines majoritaires Fractionnement +/- immunoconcentration SID-MRM-LC-MS/MS (moyen débit, multiplexage)	10	100
	Validation et développement du dosage clinique : Sensibilité et spécificité évaluées Dosage optimisé	Plasma humain représentatif d'une population (variabilité biologique normale)	Immunodosages (haut débit, pas ou peu de multiplexage)	4-10	x 1000

Figure 22 : Etapes de développement d'un candidat biomarqueur (traduit de (Rifai, Gillette et al. 2006))

En vue des dernières étapes, la méthode de dosage utilisée acquiert sa version définitive à travers une étape d'optimisation, en privilégiant les techniques hauts débits comme les immunodosages par exemple. En effet, la validation des quelques biomarqueurs qui répondent favorablement aux critères de vérification se fait sur plusieurs milliers d'échantillons, reflétant la variabilité interindividuelle de la population concernée par ce biomarqueur.

4.4. A ne pas confondre : antigène et biomarqueur tumoral

Un antigène tumoral est une molécule présente chez les cellules tumorales (le plus souvent à leur surface) et absente ou peu abondante sur les cellules normales environnantes. Les antigènes tumoraux engendrent une réponse immunitaire chez l'hôte. Ils sont utiles pour identifier des cellules tumorales dans une approche diagnostique et sont des candidats

potentiels pour une utilisation en thérapie. Ces antigènes peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur profil d'expression : Les antigènes spécifiques de la tumeur (TSA, *tumor specific antigens*), qui sont uniquement exprimés par les cellules tumorales et non par les autres cellules ; et les antigènes associés aux tumeurs (TAA, *tumor associated antigens*), qui sont surexprimés par les cellules tumorales mais également exprimés par des cellules normales (en plus faible quantité ou uniquement pendant le développement fœtal). Pour une revue complète sur l'utilisation et la découverte de nouveaux antigènes tumoraux, voir la revue en annexe.

4.5. La spectrométrie de masse comme outil d'identification de biomarqueurs

La spectrométrie de masse occupe une place privilégiée parmi les techniques d'analyse. Elle présente des applications variées depuis la physique atomique et la chimie physique jusqu'à la médecine. Ces diverses applications, tant qualitatives que quantitatives, sont liées à ses caractéristiques : sensibilité et spécificité. La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui permet de déterminer la masse moléculaire d'un composé chimique ou biologique. Cette technique a une place privilégiée dans le domaine de l'analyse grâce à sa faible consommation d'échantillon (parfois de l'ordre de la femtomole) et donc sa sensibilité, à sa grande résolution, et à la relative rapidité des analyses.

Un spectromètre de masse comprend fondamentalement les éléments suivants : un système d'introduction de la substance à analyser, une source permettant le passage de cette substance sous la forme d'ions à l'état gazeux, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les divers ions produits, un détecteur pour compter les ions et enfin, un système de pilotage de l'instrument et de traitement des données acquises fournissant le spectre de masse (Fig. 23). Une molécule subit une ionisation au niveau de la source. Au niveau de l'analyseur, les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Enfin le détecteur collecte ces ions, quantifie leur intensité et amplifie le signal. Le traitement des données se fait ensuite par informatique et donne le spectre de masse. Après le détecteur, un système informatique permet le traitement des données et génère un spectre de masse qui précise la variation du courant ionique observé en fonction du rapport m/z et permet de déterminer la masse moléculaire de l'espèce analysée.

Depuis le développement des sources d'ionisation dites douces, le MALDI et l'électrospray, par Tanaka et Fenn au cours des années 1980 (Prix Nobel 2002) (Fenn, Mann et al. 1989 ; Tabet and Rebuffat 2003), la spectrométrie de masse a connu un essor

considérable dans le monde de la biologie. Les applications dans ce domaine sont très nombreuses et notamment dans l'étude des protéines. La spectrométrie de masse peut en effet intervenir en contrôle-qualité pour déterminer la pureté et l'homogénéité d'une protéine, ou être utilisée en protéomique pour identifier les protéines (Gevaert and Vandekerckhove 2000). Elle est également un outil de choix dans les études structurales pour la vérification fine d'une séquence, la localisation de certains motifs, les études de changement de conformation et de repliement, la caractérisation de complexes covalents ou non et de leurs zones d'interaction. Les sources, analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareil. Le choix d'un type de source ou d'un type d'analyseur dépendra de la nature de l'échantillon à analyser et du type de donnée souhaité (sensibilité, résolution et précision de mesure).

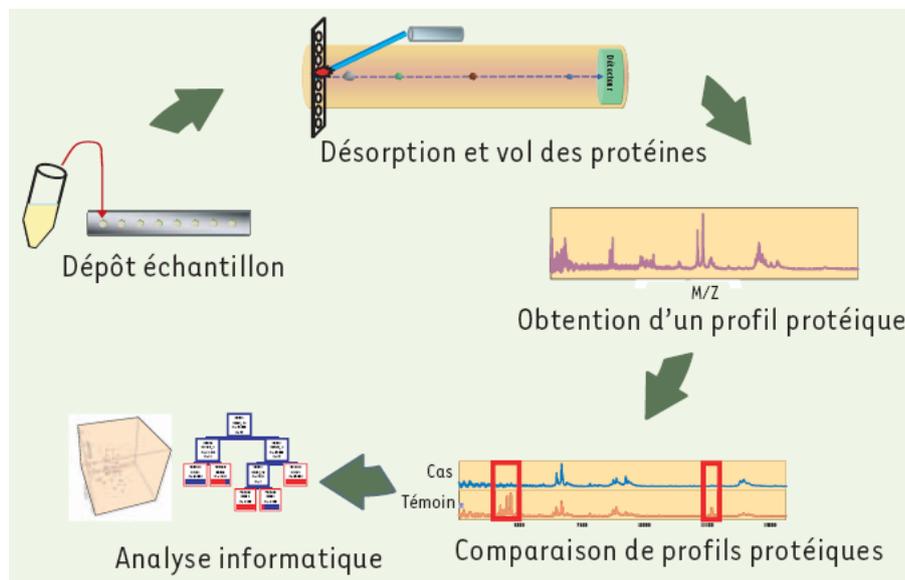


Figure 23 : Principe de la technologie SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption and ionization time-of-flight) (<http://id.erudit.org/iderudit/011453ar>).

Dans le cadre du cancer du sein, plusieurs études utilisant la spectrométrie de masse ont déjà été publiées. Nous pouvons citer par exemple une étude sur les changements d'expression des protéines dans différents stades de cancer du sein classé en fonction du stade N de ce cancer (ganglions lymphatiques régionaux) (Lee, Lim et al. 2012). Les profils d'expression des protéines cancéreuses du sein ont été cartographiés par une approche protéomique qui comprend des électrophorèses bidimensionnelles sur gel de polyacrylamide et l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Différents biomarqueurs

potentiels pour chaque étape N ont pu être identifiés (Lee, Lim et al. 2012). Dans un autre exemple, des expériences de chromatographie sur lectine ont été suivies d'une analyse par SM pour cribler des milieux de lignées cancéreuses du sein en fonction de leur agressivité (Drake, Schilling et al. 2012). Des marqueurs ont pu être retrouvés comme étant exprimé uniquement dans les lignées cancéreuses triple négatives, qui correspondent au cancer le plus agressif (Drake, Schilling et al. 2012).

Pour une revue complète sur la découverte de nouveaux biomarqueurs tumoraux, voir la revue en annexe.

Partie III :

Des outils efficaces

1. Les anticorps sous toutes leurs formes

1.1. Les anticorps monoclonaux

La structure des anticorps monoclonaux ayant été décrite précédemment dans le manuscrit, nous allons ici discuter plus spécifiquement de leur isolement et de leur production. Les immunoglobulines présentent une grande diversité expliquée : par leur variabilité isotypique, liée aux différents types de chaînes légères et lourdes pour tous les individus d'une même espèce ; par leur variabilité allotypique, qui est observée entre individus d'une même espèce ; et par leur variabilité idiotypique, qui est observée entre les anticorps provenant de plasmocytes différents chez un individu. Par conséquent, il est extrêmement difficile d'utiliser les anticorps sériques, dits polyclonaux, comme outils dans les réactions immunochimiques car les différents types d'anticorps interfèrent entre eux. De plus, les anticorps sont produits *in vivo* par les plasmocytes qui ne peuvent pas être cultivés *in vitro*. C'est pour ces raisons que la recherche s'est longtemps penchée sur le problème de la production d'anticorps.

1.1.1. Isolement de nouveaux anticorps : la technique de l'hybridome

En 1975, Köhler et Milstein ont développé une méthode de culture de cellules produisant des anticorps de spécificité définie (Kohler and Milstein 1975). Le principe de cette technique repose sur la constitution d'un hybridome, c'est-à-dire la fusion entre un plasmocyte (clone) sécrétant un type d'anticorps spécifiques (suite à l'immunisation d'un animal, par exemple la souris), et une cellule de myélome qui confère à l'hybridome une capacité de prolifération illimitée (Fig. 24). L'hybridome produit alors une catégorie d'anticorps dirigés contre un type d'antigène, spécificité provenant du plasmocyte unique employé dans la fusion. On parle donc d'anticorps monoclonaux, par opposition aux anticorps polyclonaux issus de plasmocytes différents.

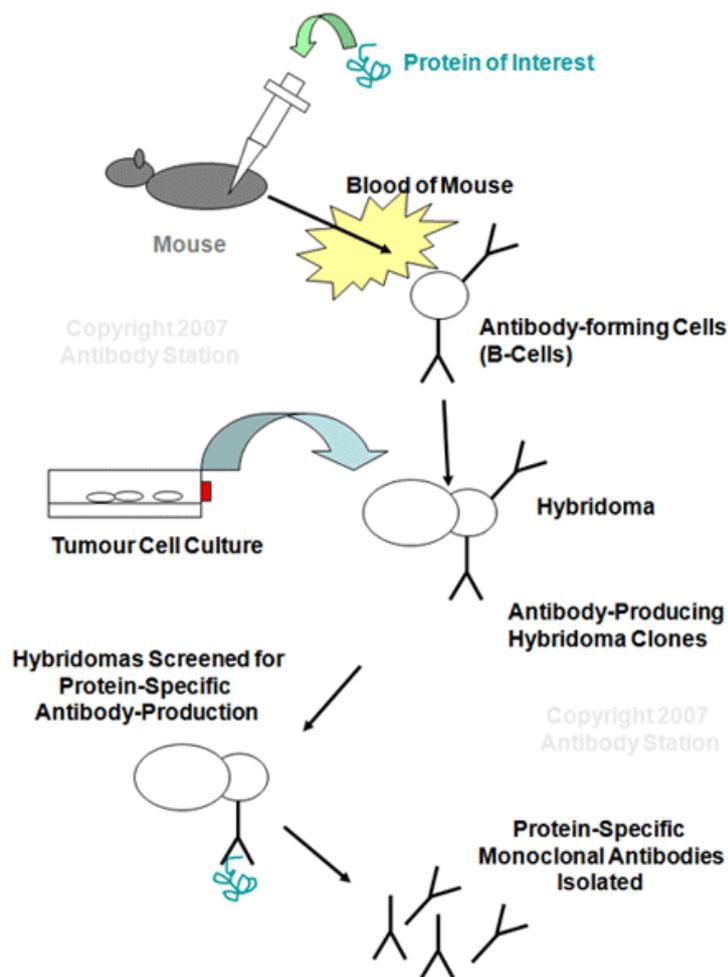


Figure 24 : Représentation schématique de la production d'anticorps monoclonaux par la technique de l'hybridome (<http://www.rec-us.net>).

1.1.2. La production

Il existe deux grands types de procédés pour produire des anticorps monoclonaux : des procédés fondés sur la culture cellulaire et des procédés faisant appel à la transgénèse. Actuellement, les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont produits dans des cellules eucaryotes de mammifères, principalement de type CHO ("Chinese Hamster Ovary"). Ce type de cellules a pour intérêt la possibilité de reproduire les modifications post traductionnelles, comme la N-Glycosylation, proches de celles observées *in vivo* dans les cellules humaines. Les lignées cellulaires sont cultivées en suspension dans des milieux de culture sans protéine, en particulier sans protéine d'origine animale. Les procédés de fabrication sont mis au point dans des unités pilotes, puis transférés dans des unités de fabrication, pour des productions

dans des réacteurs pouvant atteindre une capacité de 20 000 L (Birch and Racher 2006). Enfin, la purification des anticorps est réalisée à partir de surnageant de culture, qui est dans un premier temps clarifié et concentré. Une chromatographie d'affinité sur protéine A est ensuite utilisée, sachant que dans la majorité des cas, il s'agit d'anticorps de type IgG. Au moins une étape de chromatographie d'affinité est alors ajoutée au procédé, ce qui permet d'éliminer et les protéines de la lignée productrice contaminantes (HCPs pour "Host Cell Proteins"). Un traitement permettant une inactivation de virus enveloppés potentiellement présents ainsi qu'une étape de nanofiltration, permettant d'éliminer les particules virales, complètent le procédé de purification pour assurer une sécurité biologique maximale. Une fois purifiés, les anticorps monoclonaux sont généralement conditionnés sous forme liquide et aux concentrations souhaitées, après échange du tampon de purification par le tampon final lors des étapes d'ultrafiltration/diafiltration (Shukla, Hubbard et al. 2007).

1.2. Les anticorps recombinants

1.2.1. Historique et description des différents formats

Une molécule complète d'anticorps possède donc la double capacité de se lier à un antigène de façon spécifique et d'entraîner, *via* sa région Fc, différentes fonctions effectrices. Toutefois, si l'objectif poursuivi est de conserver simplement la fonction de reconnaissance d'un antigène utile dans diverses applications comme les immunoessais, il est possible aujourd'hui de créer et de produire par voie recombinante de nouveaux fragments d'anticorps. Porter a démontré, en 1959 (Porter 1959), qu'il était possible d'obtenir des fragments d'anticorps en réalisant des digestions enzymatiques. Malgré le développement de la technologie des Ac monoclonaux, de nombreuses applications spécifiques se sont heurtées à une faible stabilité ou à une spécificité insuffisante de ces derniers. Le développement de l'ingénierie des fragments d'anticorps a donc été entrepris, afin de tenter de résoudre ces problèmes. Divers fragments d'anticorps recombinants Fab, Fv (fragments variables), scFv (*single chain Fv*) et dsFv (*disulfide bond stabilised Fv*), contenant tous, les sites de reconnaissance spécifique des anticorps ont alors été développés (Better, Chang et al. 1988 ; Hoogenboom, Griffiths et al. 1991) (Fig. 25).

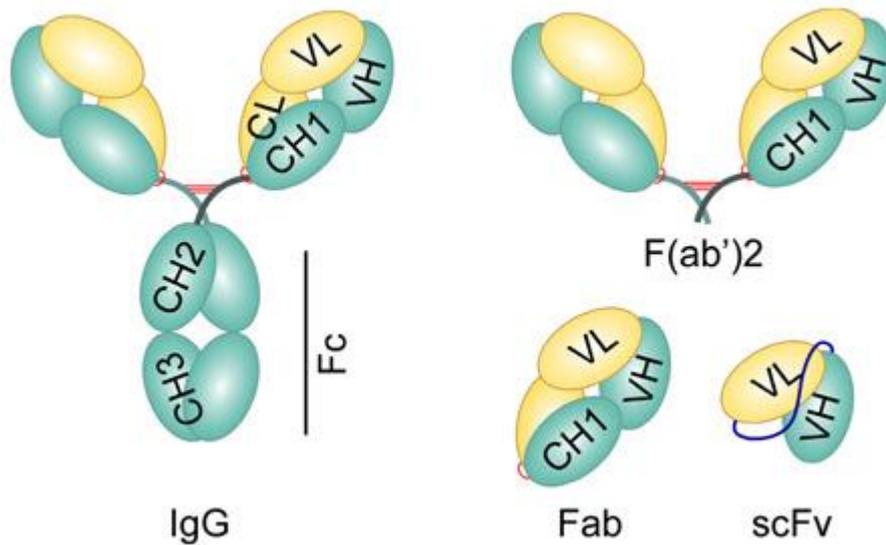


Figure 25 : Représentation de différents formats d'anticorps recombinants (Peterson, Owens et al. 2006).

Ces fragments peuvent être monovalents ou polyvalents. Ces dérivés possèdent différents avantages comme la capacité d'être exprimés dans des hôtes comme *E.coli* et la levure, ce qui réduit les coûts de production de façon importante. Les fragments Fv sont constitués par les deux modules variables VH et VL assemblés sous forme fonctionnelle, et interagissent de façon monovalente avec leur antigène. Cependant, l'interaction entre les deux modules est très faible, la structure du Fv est donc peu stable. En effet, dans le fragment Fab, les deux chaînes sont maintenues sous forme d'hétérodimères par les interactions entre domaines VH et VL, mais surtout par la formation d'un pont disulfure à l'extrémité C-terminale des domaines CH1 et CL. Les domaines variables ont tendance à se dissocier une fois dilués car le fragment Fv est dépourvu des domaines CH1 et CL. Bird et al. ont proposé, en 1988 (Bird, Hardman et al. 1988), une solution consistant à relier les deux domaines par une séquence flexible de liaison de 10 à 25 aa (*Linker*). Le résultat est une molécule de fragment variable en chaîne unique (scFv) (Worn and Pluckthun 2001). Ce fragment scFv (28 kDa), conserve l'affinité du fragment Fab pour son antigène et peut être aisément exprimé dans plusieurs systèmes de productions (Verma, Boleti et al. 1998). Le peptide de liaison (Gly₄ Ser)₃ est le « *linker* » le plus classiquement utilisé pour joindre les deux modules VH et VL, mais d'autres séquences peuvent être également utilisées (Bird, Hardman et al. 1988). Selon le *linker* utilisé, les fragments scFv peuvent être plus ou moins facilement dégradés par protéolyse. Avec le développement des techniques de l'ingénierie génétique, ces limitations

ont été surmontées, grâce aux recherches portant sur l'amélioration de la stabilité, la solubilité et de la fonctionnalité des scFv (Worn and Pluckthun 2001). Une alternative intéressante propose de lier de façon covalente les deux domaines variables, en rajoutant une cystéine par domaine au niveau de l'interface VH-VL. L'établissement du pont disulfure a permis de stabiliser la structure du scFv (Reiter, Brinkmann et al. 1996) et a donné naissance aux dsFv (disulfide stabilized Fv). Cette technique permet la plupart du temps d'obtenir des produits plus stables mais ajoute une difficulté lors du repliement de la protéine.

Il existe une dernière classe d'anticorps recombinant tout à fait original. En effet, en 1993, Hamers-Casterman et al. (Hamers-Casterman, Atarhouch et al. 1993) ont découvert que les camélidés produisent des anticorps dépourvus de chaîne légère reconnaissant leur antigène par un domaine variable unique. Ce domaine est nommé *single domain antibody* (sdAb) ou VHH (*variable domain of heavy chain of heavy chain antibody*) et possède des propriétés très intéressantes pour des applications en biotechnologies. En effet, il s'agit d'un domaine unique, stable, facile à cloner et très efficacement produit en système bactérien. De plus ces sdAbs reconnaissent le plus souvent des épitopes inaccessibles aux anticorps monoclonaux. Ces anticorps et leurs applications seront décrits plus en détails dans la suite de cette partie.

Par la suite, plusieurs équipes ont établi des approches d'ingénierie des anticorps permettant tout d'abord de conférer partiellement les propriétés des VHH de lama aux VH humains (camélisation) par la substitution de résidus clés (Riechmann and Muyldermans 1999), puis finalement de sélectionner *in vitro* à partir de grandes banques de domaines VH ou VL (L pour *light chain*) humains optimisés, des sdAb humains dont les propriétés de stabilité et de rendement d'expression se rapprochaient de celles des sdAb naturels (Famm, Hansen et al. 2008).

1.2.2. Les banques d'anticorps recombinants

Une application essentielle des anticorps recombinants a été la construction de banques combinatoires de fragments d'anticorps pour la réalisation de sélection *in vitro* comme le phage display, qui sera abordé plus tard dans le manuscrit. Le répertoire immunitaire naïf d'un animal (répertoire avant la rencontre avec les antigènes) contient des anticorps de type IgM capables de se fixer sur la plupart des molécules avec des affinités modérées ($K_a \sim 10^6-10^7 \text{ M}^{-1}$). Ce répertoire dérive du réarrangement combinatoire des différents gènes V dans les cellules souches. Chaque cellule B ($\sim 10^8$ chez la souris et 10^{12}

chez l'homme) exprime une seule combinaison VH et VL, qui résulte d'un réarrangement V-D-J pour la chaîne lourde et V-J pour la chaîne légère. L'immunisation induit la prolifération des cellules B qui reconnaissent l'immunogène, leur différenciation en plasmocytes et la sécrétion de l'anticorps correspondant. Une maturation de l'affinité des anticorps est effectuée par un processus de sélection d'hyper mutations somatiques. C'est à ce stade que les cellules B sont généralement récoltées pour préparer les hybridomes. Les gènes réarrangés VH et VL des anticorps peuvent être amplifiés séparément par PCR (*polymerase chain reaction*), associés au hasard, puis clonés dans des plasmides permettant d'obtenir ainsi des banques combinatoires. Dans le cas de banques construites à partir d'une source « immunisée », des fragments d'anticorps de forte affinité pour l'immunogène peuvent être sélectionnés directement. Dans le cas de banques construites à partir du répertoire naïf, des anticorps d'affinité modérée peuvent être sélectionnés contre une grande variété d'antigènes sans recourir à l'immunisation (Griffiths, Malmqvist et al. 1993). Les banques combinatoires naïves dites naturelles, sont construites à partir des gènes réarrangés VH (V-D-J) et VL (V-J) de l'animal. Les banques combinatoires naïves dites synthétiques, sont construites à partir des différents gènes (V, D, J) non réarrangés. Leur réarrangement est réalisé *in vitro* par PCR. L'utilisation d'oligonucléotides aléatoires correspondant aux régions CDR (*complementarity determining regions*) (Hoogenboom and Winter 1992) permet d'augmenter la diversité de la banque. Il a été montré que plus la banque combinatoire naïve est complexe, plus il est possible d'isoler des anticorps contre n'importe quel antigène et plus leur affinité est élevée. L'infection combinatoire a permis d'obtenir des banques naïves de plus de 10^{10} fragments Fab différents présentant de bonnes affinités ($K_a \sim 10^8-10^9 \text{ M}^{-1}$) pour une très grande variété d'antigènes (Griffiths, Williams et al. 1994). Bien des aspects du système immunitaire naturel sont donc ainsi copiés. Souvent, des processus de maturation *in vitro* doivent être appliqués pour obtenir les « meilleurs » anticorps en terme de spécificité et d'affinité. Les permutations de chaînes qui ont lieu durant le développement des cellules B peuvent être mimées *in vitro* par la technique de l'échange de chaînes (*chain shuffling*) dans laquelle une chaîne (VH ou VL) est gardée puis réassociée à toutes les autres chaînes de la banque (Winter, Griffiths et al. 1994). La maturation de l'affinité est également assurée par introduction de mutations dans les CDR des fragments sélectionnés. Le système artificiel des banques combinatoires s'est donc avéré particulièrement intéressant pour toute production d'anticorps pour laquelle l'immunisation est difficile voire impossible. C'est le cas de certains anticorps humains ou encore d'anticorps dirigés contre des molécules très conservées non immunogènes.

1.3. Les anticorps simple domaine de camélidés

1.3.1. Historique

Dans un article visionnaire (Ward, Gussow et al. 1989), l'équipe de Greg Winter démontrait dès 1989 qu'il était possible d'obtenir des affinités de l'ordre de la dizaine de nanomolaires en utilisant uniquement les domaines variables (V) VH (H pour *heavy chain*) d'anticorps de souris obtenus par sélection *in vitro* à partir d'animaux immunisés. Les auteurs créèrent pour l'occasion le terme sdAb pour *single domain antibodies*. Ils mentionnaient déjà la propriété qu'avaient ces sdAbs de cibler des épitopes inaccessibles aux anticorps conventionnels. Cette découverte est restée anecdotique jusqu'en 1993 quand une équipe a mis en évidence la présence d'anticorps conventionnels mais aussi d'anticorps dénués de chaînes légères et de domaines CH1 (C pour *constant domain*) dans le sérum de dromadaires (Hamers-Casterman, Atarhouch et al. 1993). Ces anticorps dénommés HcAb pour *heavy chain only antibodies* lient leurs cibles par un seul domaine variable nommé VHH pour le différencier des VH conventionnels. Par référence à leur petite taille, les sdAbs de dromadaires, considérés comme les plus petits fragments d'anticorps actifs, sont parfois nommés *nanobodies*. Il est à noter que tous les camélidés, incluant les chameaux, lamas et vigognes, expriment ce type d'anticorps en proportion variant de 25 à 50% du répertoire IgG sériques (van der Linden, de Geus et al. 2000). La présence de ces HCAB n'a été observée chez aucun autre mammifère en dehors des camélidés, sauf chez l'homme atteint de la maladie des chaînes lourdes (syndromes lymphoprolifératifs B rares) mais ils sont alors non fonctionnels. Par contre, des anticorps similaires ont été découverts chez certains types de requins (Greenberg, Avila et al. 1995). Ils sont alors appelés Ig- NAR (pour *new antigen receptor*) et leur unique domaine variable a été baptisé V-NAR.

1.3.2. Description des VHHs

La chaîne lourde des HCABs est composée d'un domaine variable VHH suivi d'une région charnière puis des domaines CH2 et CH3 (Fig. 26). Les séquences d'ADNc montrent clairement que l'équivalent du domaine CH1 présent entre le VH et la région charnière est manquant. Il semble qu'une mutation à l'extrémité 3' de l'exon CH1 soit responsable de l'exclusion sélective de la séquence du CH1 au cours de l'épissage de l'ARNm (Nguyen, Hamers et al. 1999). La comparaison de la famille de gènes VH3 humains avec les VHHs de

Camélidés montre un fort degré de similarité avec cependant plusieurs substitutions dans des régions particulières. En comparant la région charpente des VHs et des VHHs, quatre substitutions d'acides aminés sont observées (Muyldermans, Atarhouch et al. 1994). Ces substitutions (de VH vers VHH) (selon la numérotation de Kabat), V37F ou V37Y, G44E, L45R et W47G, rendent cette partie du domaine plus hydrophile, diminuant probablement la capacité des VHHs à former des hétérodimères avec les domaines VLs (Fig. 26). Des substitutions sont également observées dans la région constante des VHHs : P14A, A83P et L11S (de VH vers VHH). Dans les VHs, ces résidus, en particulier L11, sont en contact avec le domaine CH1 (Padlan 1994). L'absence de ce domaine dans les HCAs suggère donc que ces acides aminés sont exposés dans les VHHs. Il est ainsi légitime de croire que l'augmentation de la polarité provoquée par les mutations de la région charpente 2 contribue à la solubilité et stabilité des domaines VHH (Muyldermans, Atarhouch et al. 1994).

Les VHHs présentent également des différences majeures avec les VHs au niveau de leurs régions hypervariables (CDR, Complementarity determining regions). Tout d'abord, la région hypervariable CDR3 des VHHs est en moyenne plus longue (16 -18 acides aminés) que celle des VHs humain ou murins (12 et 9 acides aminés respectivement) (Wu et al., 1993) même si certains VHHs semblent avoir un CDR plus court d'environ 6 acides aminés (Harmsen, Ruuls et al. 2000). Comme pour les séquences, les plus grandes différences structurales entre les VHs et les VHHs se retrouvent au niveau des régions hypervariables.

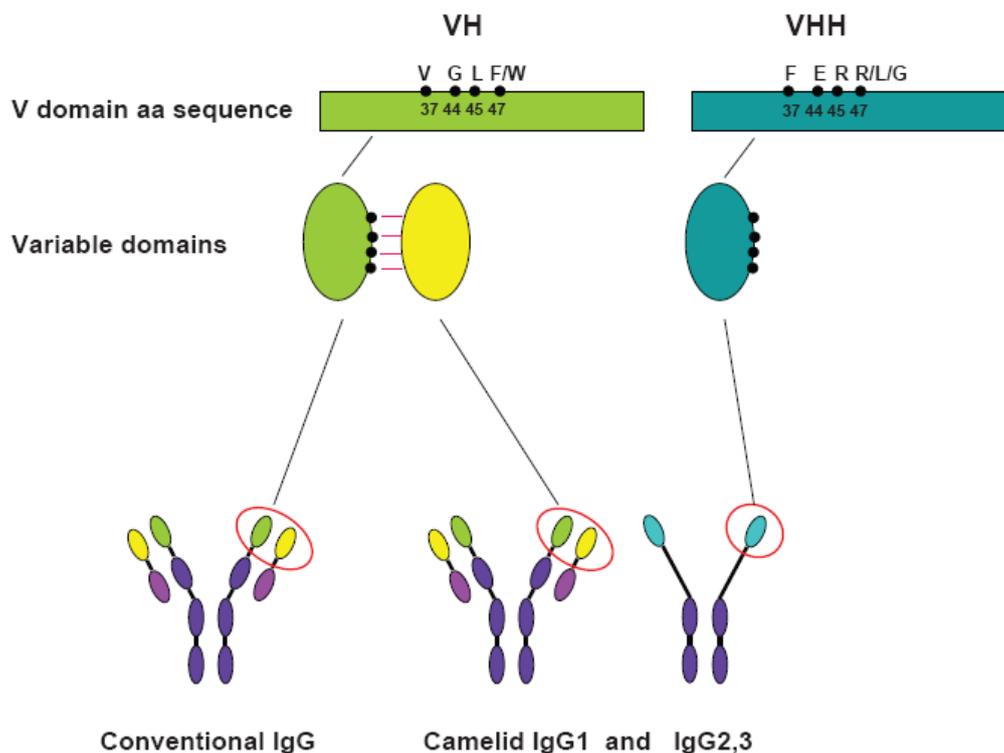


Figure 26 : Représentation des caractéristiques spécifiques des sdAbs (de Marco 2011). Les anticorps simple domaine peuvent dériver de différentes immunoglobulines. Les VHs et les VHHs de camélidés diffèrent par 4 acides aminés cruciaux pour la conservation de la stabilité du domaine variable (selon la numérotation de Kabat).

1.3.3. Propriétés des VHHs

La nature « simple domaine » des VHHs leur confère des caractéristiques uniques par rapport aux formats d'anticorps classiques dérivés des anticorps monoclonaux. Parce que ces VHHs sont petits et compacts, ils sont produits de façon très efficace chez *E. coli* ou la levure. Sans aucune optimisation, les VHHs sont produits en routine à 10-100 mg par litre de culture chez *E. coli*, ce qui correspond à un rendement moyen 10 fois meilleur que la plupart des scFv. Les VHHs de lama sont, de plus, caractérisés par une très bonne solubilité et une excellente stabilité. Ils sont par exemple capables de recouvrer leur activité après une incubation à très haute température (80-90°C) (Dumoulin, Conrath et al. 2002) ou de conserver, dans un milieu réducteur, leur liaison à l'antigène malgré l'absence de pont disulfure (Tanaka, Lobato et al. 2003). Ces sdAb de lama, qui possèdent déjà une séquence très similaire au sous-groupe VH3 des VH humains (Su, Nguyen et al. 2002), peuvent de plus

être « humanisés » par substitution de quelques résidus à l'exception de deux résidus essentiels à leur stabilité et à leur solubilité (Vincke, Loris et al. 2009). Par ailleurs, et malgré leur petite taille, les VHHs sélectionnés chez des animaux immunisés présentent des affinités tout à fait comparables à celles des anticorps conventionnels. De façon très intéressante, certains sdAb interagissent de manière assez particulière avec leur antigène. Beaucoup de ces domaines présentent des boucles variables longues formant des extensions capables de s'insérer dans des cavités normalement inaccessibles telles que des sites actifs d'enzymes ; ils représentent donc une excellente source d'inhibiteurs (Lauwereys, Arbabi Ghahroudi et al. 1998) (Fig. 27). Ils peuvent aussi cibler des épitopes conservés et peu accessibles sur certaines protéines d'agents infectieux qui ont évolué pour présenter aux anticorps conventionnels des épitopes dominants hypervariables (Stijlemans, Conrath et al. 2004).

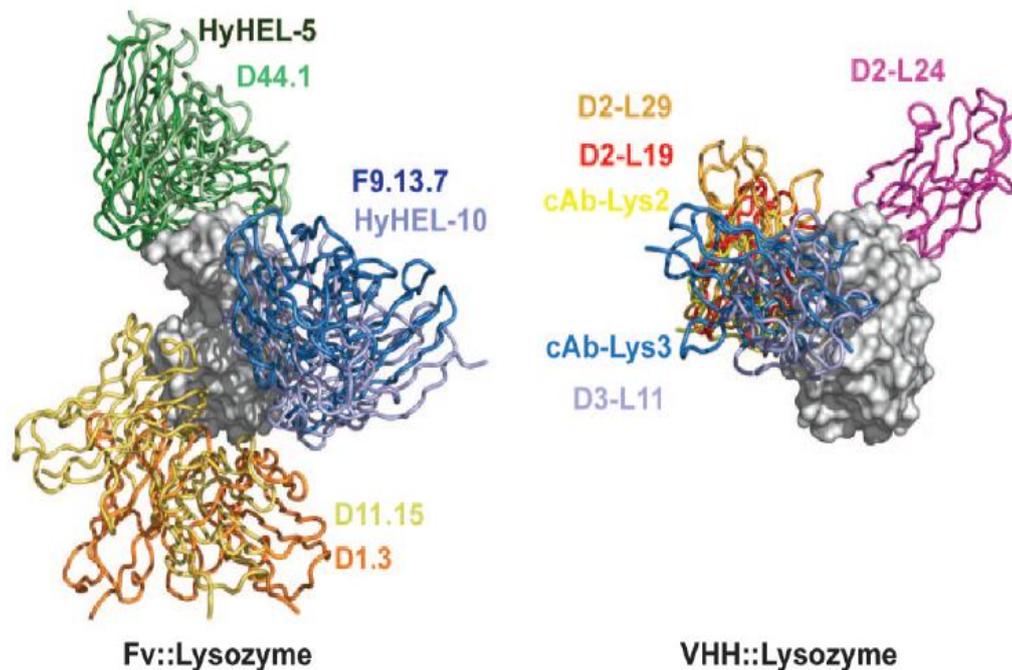


Figure 27 : Superposition des complexes anticorps-lysozyme (anticorps en couleur et lysozyme en gris). Domaine VH-VL d'anticorps classique (gauche) ; domaines VHHs (droite) (De Genst, Silence et al. 2006).

1.3.4. La construction de banques de VHHs

Le clonage du répertoire d'anticorps d'un animal immunisé dans un vecteur est une méthode bien maîtrisée depuis ces 15 dernières années (Winter, Griffiths et al. 1994 ;

Hoogenboom, de Bruine et al. 1998). Cette puissante technique est très facilement adaptable aux VHHs, et la nature de ces anticorps simplifie considérablement le travail. En effet, le clonage du répertoire des anticorps recombinants conventionnels (comme par exemple les scFv) comprend plusieurs étapes. Tout d'abord deux PCR indépendantes sont nécessaires pour amplifier les VH et les VL. Puis, ces fragments doivent être joints dans une construction par un linker, par PCR de chevauchement ou par clonage en deux étapes. Ensuite, 10^5 VH et 10^5 VL sont amplifiés à partir de 10^5 cellules B, ce qui nécessite le clonage de 10^{10} clones pour obtenir toutes les possibilités combinatoires. Ce système peut être avantageux pour créer des banques naïves de grande diversité, mais cela reste très fastidieux et lourd à réaliser. Le clonage du répertoire de HCAb d'un animal immunisé est nettement moins compliqué, puisque le fragment d'anticorps désiré est codé par un seul gène, le VHH. Ceci commence par l'isolement des lymphocytes du sang périphérique pour préparer l'ADNc. Tous les VHHs sont codés par un seul exon avec des séquences homologues aux extrémités puisqu'ils viennent d'une seule famille de gène. Donc, le répertoire complet de VHH d'un animal immunisé peut être amplifié par un mélange unique d'amorces pour être cloné immédiatement. La méthode peut être un peu plus compliquée s'il est requis d'éliminer les VH provenant des anticorps conventionnels. Une des méthodes utilisée pour éliminer les gènes des fragments VH est basée sur le fait qu'un VH n'est jamais trouvé dans un HCAb et qu'il existe une différence de taille significative entre la chaîne lourde des anticorps conventionnels et un HCAb (van der Linden, de Geus et al. 2000). A partir de ces observations, l'utilisation d'amorces qui hybrident sélectivement la région charnière des HCAb permet d'amplifier uniquement les gènes des VHHs. Après le clonage des gènes des VHHs dans un vecteur d'expression approprié, une banque contenant le répertoire intact des VHHs maturés *in vivo* est obtenue. Au contraire des banques de scFv, une petite banque de 10^6 - 10^7 clones de VHH suffit pour obtenir des anticorps avec des affinités de l'ordre du nanomolaire pour leurs antigènes.

1.3.5. Applications des VHHs

Les VHHs peuvent donc se différencier des autres formats d'anticorps par leurs multiples propriétés uniques de taille, solubilité, stabilité et de rendement d'expression. Toutes ces caractéristiques mènent à un nombre d'applications où les VHHs se montrent plus efficaces que les autres formats d'anticorps. Nous allons voir ici une liste non exhaustive de quelques applications possibles avec les VHHs.

1.3.5.1. Utilisation des VHHs en imagerie *in vivo*

Un diagnostic *in vivo* efficace et rapide à un stade précoce de la maladie reste un challenge majeur dans le diagnostic des cancers ou des infections. La molécule idéale pour l'imagerie du cancer doit réaliser un marquage suffisant pour détecter de très petites métastases avec un minimum de bruit de fond. Elle doit se fixer rapidement à la tumeur avec une haute affinité et sans marquer les tissus en nécrose. De plus, les molécules non liées à la tumeur doivent rapidement être éliminées pour réduire le temps entre l'administration de la molécule et l'imagerie proprement dite pour minimiser l'exposition du patient aux radiations. Les molécules d'imagerie commercialisées à l'heure actuelle sont dérivées d'anticorps monoclonaux murins. Ces anticorps souffrent d'une grande immunogénicité, d'une élimination lente par l'organisme et d'une mauvaise pénétration dans les tumeurs du fait de leur grande taille. Pour essayer de pallier ce problème, des formats scFvs ont été utilisés mais leur instabilité rend leur utilisation inefficace.

La petite taille des VHHs les rend tout à fait adaptés à l'imagerie car elle leur confère un haut potentiel de pénétration dans la tumeur ainsi qu'une élimination rapide par l'organisme. Les propriétés pharmacocinétiques des VHHs peuvent facilement être optimisées en jouant sur leur taille ou leur oligomérisation. Récemment, une étude a été réalisée sur les propriétés d'un VHH anti-EGFR (Iqbal, Trojahn et al. 2010). L'anticorps, utilisé sous différents formats modifiant sa valence (monovalent, bivalent, pentavalent), a été analysé *in vitro* pour son affinité de liaison et *in vivo* pour des analyses de biodistribution, pharmacocinétiques, en imagerie optique et microscopie à fluorescence. Les analyses cinétiques par résonance plasmonique de surface ont révélé des affinités intrinsèques de 55 nM contre EGFR pour la forme monovalente du VHH et une affinité apparente 10 à 600 fois plus importante pour les formats multivalents. Les études pharmacocinétiques *in vivo* chez la souris ont révélé une demi-vie plasmatique de 41 min pour le format monovalent, 80 min pour le bivalent et 12,5 h pour le pentavalent. Les anticorps simple domaine peuvent donc être optimisés pour réaliser de l'imagerie en modifiant leur affinité apparente et prolongeant leur demi-vie, tout en conservant leur capacité à pénétrer les tumeurs. Pour terminer, le marquage efficace d'un VHH peut facilement être optimisé par l'ajout d'un groupe réactif en C-terminal de la protéine, diminuant ainsi fortement le risque d'altérer les résidus impliqués dans la reconnaissance de l'antigène.

1.3.5.2. Utilisation en immunothérapie

La petite taille des sdAbs permet d'envisager deux sortes d'applications : soit sous forme monomérique soluble, ce qui se rapproche de l'utilisation d'une petite molécule thérapeutique, soit comme « charpente » de construction à partir de laquelle des molécules plus complexes pourraient être élaborées. Sous forme soluble, cette petite molécule sdAb a l'avantage de pouvoir pénétrer dans les tissus beaucoup plus efficacement qu'un anticorps entier, et notamment dans les tumeurs solides ; elles y joueraient le rôle d'antagoniste ou d'agoniste, en bloquant par exemple le récepteur de l'EGF (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), conduisant ainsi à des régressions tumorales *in vivo* (Roovers, Laeremans et al. 2007). Cependant, les nanobodies étant plus petits que la limite de filtration des glomérules rénaux, ils sont rapidement éliminés dans les urines. Pour éviter ce problème, une première approche consiste à coupler chimiquement une molécule de PEG (polyéthylène glycol) sur le sdAb (PEGylation) (Kubetzko, Balic et al. 2006). Une autre solution, plus élégante, consiste à fusionner un sdAb d'intérêt à un sdAb affiné pour l'albumine, protéine très abondante dans le sérum, conférant ainsi à la protéine de fusion un temps de demi-vie bien plus long, dépendant de l'affinité du sdAb anti-albumine (Tijink, Laeremans et al. 2008). Finalement, une autre solution consiste à multimériser les sdAbs (Zhang, Tanha et al. 2004), de façon à augmenter simultanément la masse moléculaire et l'affinité apparente de la molécule résultante.

L'utilisation de ces « modules sdAb » permet, de plus, de créer des molécules multivalentes et multispécifiques (Stone, Hiramata et al. 2007) capables par exemple de cibler des cellules du système immunitaire vers des cellules cibles (Behar, Siberil et al. 2008). Alternativement, les sdAbs peuvent être utilisés pour cibler spécifiquement une enzyme vers des cellules cibles dans le cadre de l'approche ADEPT (*antibody-dependent enzyme prodrug therapy*) : une prodrogue injectée dans un second temps sera transformée en drogue par l'enzyme au site ciblé. Cette stratégie a permis d'éradiquer des tumeurs humaines xénogreffées chez la souris sans effet secondaire majeur (Cortez-Retamozo, Backmann et al. 2004).

1.3.5.3. Les VHHs comme intrabodies

Une propriété importante des sdAbs est leur aptitude à conserver leur stabilité en l'absence de pont disulfure, à l'inverse de la plupart des fragments conventionnels comme les scFv. Ceci a conduit plusieurs auteurs à les utiliser comme anticorps intracellulaires

(intrabodies) capables, une fois exprimés dans le cytoplasme ou le noyau de cellules eucaryotes, de bloquer très spécifiquement une interaction précise (Tanaka, Lobato et al. 2003). Des résultats très intéressants ont ainsi été obtenus avec des VHHs intracellulaires capables de prévenir et même de faire disparaître des agrégats tels que ceux responsables de maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Prion, etc.) (Miller and Messer 2005). Un autre exemple dans l'utilisation d'intrabodies est l'inhibition de la multimérisation de la protéine Rev du VIH (virus de l'immunodéficience humaine), en séquestrant cette dernière dans le cytoplasme ce qui empêche la réplication du virus (Vercruyssen, Pardon et al. 2010). Pour rester dans l'inhibition du VIH, un anticorps à domaine unique qui se lie à la protéine Nef du VIH-1 avec une haute affinité ($K_d = 2 \times 10^{-9}M$) à été décrit comme inhibant les activités biologiques de Nef à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bouchet, Basmaciogullari et al. 2011). Un dernier exemple concerne la toxine SpvB de *Salmonella*, qui est sécrétée directement par la bactérie dans le cytoplasme de la cellule hôte. Des intrabodies dirigés contre cette cible permettent de bloquer la toxine et ainsi d'empêcher son action pathologique (Alzogaray, Danquah et al. 2011).

1.3.5.4. Les VHHs pour l'immunocapture

La nature monodomaine et la stabilité des sdAbs en font des candidats de choix pour la réalisation de puces à anticorps. Le clonage d'un seul domaine évite les problèmes de combinaison entre VH et VL et leur facilité de production en système procaryote donne la possibilité de cloner, d'exprimer et de déposer sur lame un grand répertoire de VHHs de façon rapide et efficace tout en conservant leur activité. Ces sdAbs devraient ainsi permettre un développement rapide de puces à anticorps à haute densité, avec comme enjeu final l'étude d'un protéome entier. Comme exemple, des sdAbs ont été utilisés pour préparer des piezoimmunosenseurs pour la détection de virions du VIH (Ferreira, Encarnacao et al. 2007). La possibilité de les immobiliser à haute densité et de pouvoir les orienter sur la surface permet d'augmenter fortement la sensibilité du système.

1.3.5.5. La neutralisation de virus

Les VHHs possèdent une grande boucle protubérante correspondant à leur CDR3 et cette particularité structurale représente un avantage par rapport aux anticorps conventionnels dans le ciblage d'épitopes cryptiques viraux responsables de la reconnaissance de l'hôte,

comme il a déjà été montré pour l'inhibition d'enzyme par ciblage de leur site catalytique (Lauwereys, Arbabi Ghahroudi et al. 1998). De plus, pour des raisons d'encombrement stérique, les anticorps conventionnels n'ont pas toujours accès à des épitopes qui peuvent être cachés. Un exemple est la sélection de VHHs contre une protéine conservée de capsid, VP6, du rotavirus de groupe A. Ces VHHs neutralisent le virus et protègent les souris contre la diarrhée (van der Vaart, Pant et al. 2006 ; Garaicoechea, Olichon et al. 2008), alors que les anticorps conventionnels ont des effets modérés. Dans ce cas, les VHHs sont administrés oralement aux souris. La sévérité et la longévité de la maladie sont significativement diminuées en raison d'une diminution de la charge virale.

Un autre exemple concerne des VHHs dirigés contre la protéine gp120 du VIH (Forsman, Beirnaert et al. 2008). Ces anticorps isolés permettent une neutralisation large spectre du virus, en ciblant un épitope cryptique conservé de la gp120 qui est impliqué dans la liaison au CD4 (Hinz, Lutje Hulsik et al. 2010). Pour finir, l'assemblage de VHHs anti viraux en format multivalent a montré une augmentation de l'action neutralisante et une diminution du pouvoir infectieux de plusieurs virus comme par exemple les virus de la grippe ou de la rage (Hultberg, Temperton et al. 2011; Ibanez, De Filette et al. 2011). Le ciblage simultané de différents épitopes d'un même virus semble une alternative prometteuse pour augmenter l'avidité d'un anticorps multivalent (Hultberg, Temperton et al. 2011).

1.3.5.6. Le ciblage d'haptènes

Les petites molécules ne sont pas la cible idéale pour les anticorps simple domaine puisque elles possèdent un nombre limité d'épitopes conformationnels disponibles pour la reconnaissance par les paratopes protubérants des VHHs. Malgré cela, il existe plusieurs exemples montrant que les VHHs peuvent être utilisés pour détecter des haptènes comme des herbicides, la caféine, des mycotoxines, des stéroïdes ou des médicaments (Yau, Groves et al. 2003 ; Ladenson, Crimmins et al. 2006 ; Sheedy, Yau et al. 2006 ; Alvarez-Rueda, Behar et al. 2007 ; Anderson and Goldman 2008 ; Doyle, Arbabi-Ghahroudi et al. 2008 ; Doyle, Saeed et al. 2009 ; Kobayashi, Oyama et al. 2009).

1.3.5.7. La cristallographie

La possibilité d'utiliser des anticorps pour stabiliser la conformation d'une protéine afin de réaliser sa cristallisation a été reconnue depuis longtemps (Amit, Mariuzza et al.

1986 ; Hunte and Michel 2002 ; Ermolenko, Zherdev et al. 2004). Cependant, les anticorps conventionnels ou leur forme recombinante ont des limitations en raison de leur taille (IgG et Fab) ou de leur faible stabilité (scFv). De ce fait, d'autres molécules ont été proposées comme les affibodies ou la fibronectine (Hogbom, Eklund et al. 2003 ; Lipovsek, Lippow et al. 2007). Les VHHs sont une alternative logique puisque qu'ils peuvent être produits en masse rapidement, ils ont de fortes affinités, une petite taille. Il a été montré qu'ils peuvent induire une conformation spécifique de leur protéine cible en s'y fixant et que ces interactions sont très stables donc tout à fait propices à la formation de cristaux (Dolk, van Vliet et al. 2005; Tereshko, Uysal et al. 2008). De plus, les VHHs sont très flexibles au niveau de leur interface d'interaction et peuvent ainsi s'adapter à une grande variété d'épitopes et bloquer les régions flexibles de leurs antigènes (Loris, Marianovsky et al. 2003). Les approches utilisant les VHHs ont permis la résolution de plusieurs structures ces dernières années (Conrath, Pereira et al. 2009 ; Korotkov, Pardon et al. 2009 ; Lam, Pardon et al. 2009 ; Rasmussen, Choi et al. 2011; Wu, Park et al. 2011). Les VHHs semblent favoriser la formation de cristaux et accélérer de façon drastique la cristallisation de complexes protéiques récalcitrants (Wu, Park et al. 2011). Dans le cas de la protéine KREPA6, une protéine de l'éditosome, tous les cristaux obtenus ont été réalisés en utilisant des VHHs comme protéines chaperonnes (Wu, Park et al. 2011). Dans le cas de l'étude du récepteur couplé aux protéines G, le β_2 adénorecepteur, l'utilisation des VHHs est utile à plusieurs niveaux. Bien que la cristallisation de l'état inactif de certains membres des récepteurs de cette famille est déjà été obtenue, tous les efforts pour obtenir une structure du récepteur à l'état actif ont été vains en raison de l'instabilité de ce dernier en l'absence de protéine G. Pour ces raisons, des VHHs agonistes de haute affinité ont été sélectionnés pour maintenir le récepteur sous sa forme active de façon stable, et enfin permettre la cristallisation du récepteur sous sa forme active (Rasmussen, Choi et al. 2011).

1.3.5.8. Le ciblage de toxines

L'utilisation d'anticorps simple domaine pour l'identification et la neutralisation de toxines a augmenté exponentiellement ces deux dernières années. Il existe deux raisons principales pour expliquer ce phénomène : la possibilité d'utiliser des banques immunes et l'obtention d'anticorps très stables mais tout à fait adaptés à l'ingénierie. La stabilité des VHHs est une caractéristique cruciale quand des conditions rigoureuses sont utilisées telles que des températures élevées ou des fortes concentrations en détergeant ou en agent réducteur

(Olichon, Schweizer et al. 2007 ; Dona, Urrutia et al. 2010; Dong, Thompson et al. 2010). Des toxines comme la ricine ou la toxine botulique sont classées comme arme biologique et font pour cela l'objet d'une attention particulière. La neurotoxine *Clostridium botulinum* (BoNT) concerne la majorité des publications car il n'existe actuellement aucun remède pour traiter les patients atteints au niveau neuronal. L'intérêt de développer des VHHs contre BoNT est motivé par la stabilité de ces anticorps, et la possibilité de les utiliser en intrabodies, facilitant ainsi non seulement la thérapie mais aussi le diagnostique (Goldman, Anderson et al. 2008 ; Conway, Sherwood et al. 2010). Par exemple, des VHHs sélectionnés par levure display permettent d'inhiber *in vitro* l'activité protéase de la toxine (Dong, Thompson et al. 2010).

Le nombre important d'exemples utilisant les anticorps simple domaine dans différentes applications montre clairement que cette classe de réactifs immunologiques représente un outil primordial aussi bien en recherche que pour des utilisations biotechnologiques.

2. Le phage display

2.1. Introduction

Au cours de la dernière décennie, un outil de sélection et de synthèse combinatoire des protéines a été développé: le "phage display" ou la présentation de molécules à la surface de phages filamenteux. Cette technique génère un lien physique entre une protéine et son gène, permettant ainsi de sélectionner par purification d'affinité le gène codant la protéine responsable de cette affinité. Dans les années 1990, les équipes de G. Winter et de C. Barbas ont utilisé ce principe pour développer une technique extrêmement puissante. L'idée consistait à cloner à partir de lymphocytes B de souris ou d'humains l'ensemble (McCafferty, Griffiths et al. 1990) des gènes d'anticorps constituant le répertoire total de l'organisme dans un vecteur permettant d'exprimer les fragments d'anticorps correspondants à la surface de particules phagiques. Il est donc ensuite possible de sélectionner *in vitro* des fragments d'anticorps capables de se lier à des antigènes purifiés ou même à la surface de cellules, et de récupérer le gène codant ces fragments. Différentes molécules telles que des peptides aléatoires, des enzymes, des inhibiteurs de protéases, des facteurs de transcription, des

banques d'ADNc, des cytokines, des domaines extracellulaires de récepteurs ou des fragments d'anticorps peuvent être présentées en les fusionnant à une des protéines de la capsid du phage. Ensuite, les phages portant la molécule d'intérêt seront sélectionnés pour leur interaction avec une autre molécule (un antigène par exemple) fixée à un support solide et ces phages seront ensuite utilisés pour infecter une souche d'*E. coli* et ainsi enrichir la population de phages spécifiques.

2.2. Phages filamenteux

Le laboratoire de G. Smith avait démontré la possibilité d'exprimer un peptide à la surface de la capsid de phage filamenteux par fusion avec la protéine pIII ou pVIII (Smith 1985). Mais il a fallu attendre quelques années pour comprendre l'importance de ce puissant outil de sélection (Parmley and Smith 1988 ; Scott and Smith 1990).

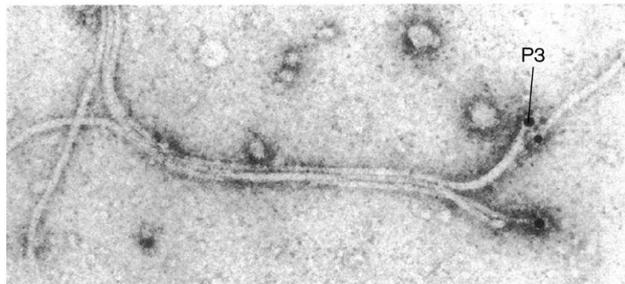


Figure 28 : Particule de phage filamenteux M13 (Barbas, Kang et al. 1991).

Les phages filamenteux M13 (Fig. 28), f1 et fd ont tous été utilisés pour la création de banques de phage display compte tenu de leur capacité commune à infecter les souches d'*Escherichia coli* exprimant le pilus codé par le facteur conjugatif F. L'infection est initiée par une interaction avec l'extrémité du pili. Le phénomène de dépolarisation des sous unités de piline intervient alors pour mettre en contact le phage avec la membrane de la cellule cible. Puis, les protéines de la capsid s'intègrent dans la membrane de la bactérie, et l'ADN simple brin du phage pénètre dans le cytoplasme de la bactérie. Dans le cytoplasme, les enzymes de la bactérie synthétisent le brin complémentaire et transforment donc l'ADN du phage en une forme double brin superenroulée dite forme de répliation (RF pour replicative form). Cette molécule sert de matrice pour la synthèse des protéines du phage. Certaines de ces protéines sont responsables de la synthèse de nouveaux ADN simples brins qui, une fois convertis en

RF, augmente la production des protéines phagiques. Les protéines de capsid et les protéines impliquées dans l'assemblage de cette capsid s'intègrent dans l'enveloppe de la bactérie. Quand la protéine V (cinq) atteint une concentration critique, elle lie l'ADN simple brin qui ne peut plus être converti en RF mais qui va être incorporé dans une nouvelle particule phagique. L'assemblage est réalisé dans l'enveloppe de la bactérie à un point où les deux membranes (interne et externe) sont en contact. Ce processus est assez bien toléré par la bactérie qui continue à se diviser bien que deux fois plus lentement qu'une souche non infectée. Approximativement 100 à 200 particules sont produites par génération.

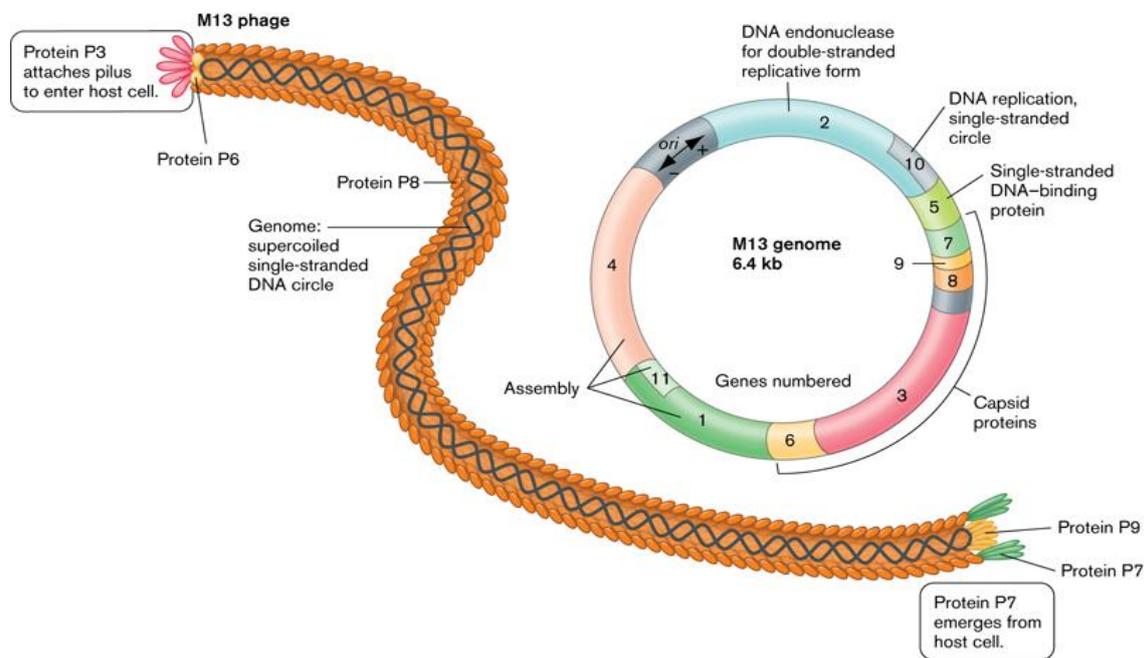


Figure 29 : Structure et génome du phage M13 (image issue du livre Microbiology, de Slonczewski et Foster)

Le génome du phage M13 contient 11 gènes et une région dite intragénique qui contient les origines de synthèse des brins + et - du phage plus un *signal d'encapsidation* (en forme d'épingle à cheveux) et qui a été utilisée pour générer des phagemides (Fig. 29). Les gènes II, V et X participent à la réplication du génome. La protéine II (pII) assure la réplication par le système du "rolling circle", pV dimérise et est responsable de la liaison à l'ADN simple brin pour le diriger vers l'encapsidation. La capsid est constituée des protéines III, VI, VII, VIII, et IX (Fig. 29). Elles sont toutes intégrées dans la membrane interne de la bactérie avant d'être incorporées dans la capsid. La plus abondante est pVIII. Présente à 2700 exemplaires, elle forme le tube entourant l'ADN. Les quatre autres protéines sont

beaucoup moins représentées dans la capsid (5 molécules par capsid environ). Elles ont toutes une partie transmembranaire et exposent leur extrémité N-terminale dans le périplasma. Les protéines XI et I sont insérées dans la membrane interne. Elles interagissent avec pIV pour former un canal dans l'enveloppe d'*E. coli*, permettant la libération du phage. La particule phagique est un cylindre flexible de 6,5 nm de diamètre et de 930 nm de long. L'une des extrémités du cylindre contient 5 protéines VII et 5 protéines IX (du côté où se trouve le signal d'encapsidation) et l'autre contient 5 protéines III et 5 protéines VI. La protéine VIII constitue le long cylindre entourant l'ADN. La protéine III est organisée en trois domaines et la majeure partie de cette protéine est exposée au milieu. C'est cette protéine qui est responsable de l'infection et de la translocation de l'ADN phagique. Les protéines pIII et pVIII ont toutes les deux été utilisées au départ pour exprimer des peptides et des protéines à la surface des phages. Mais actuellement, c'est la protéine pIII qui est habituellement utilisée pour fusionner les molécules à sélectionner (Fig. 30). Pour de petites molécules, cette fusion n'affecte pas la capacité d'infection du phage.

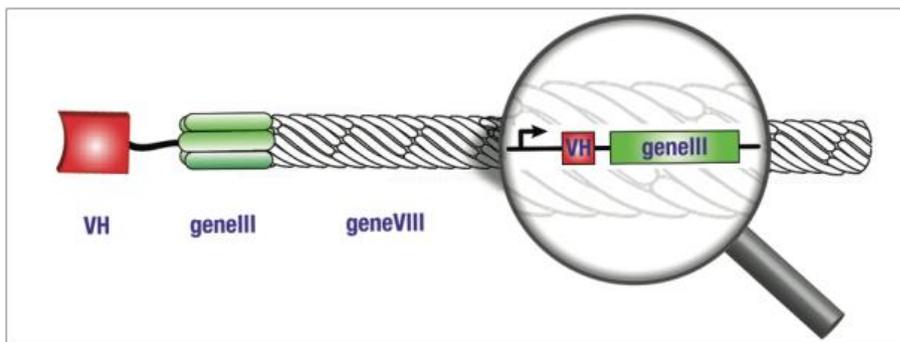


Figure 30 : Phage display de fragments d'anticorps. Le fragment d'anticorps (ici un domaine VH, en rouge) est exprimé en fusion avec la protéine pIII du phage (en vert). Les deux protéines sont codées par l'ADN phagemidique (agrandie) et exprimé à partir d'un promoteur commun (Lee, Iorno et al. 2007).

L'ADN des phages d'une banque de phage display (le phagemide) ne contient que l'information nécessaire à la production de la protéine pIII recombinante et à la réplication du génome. Le reste du matériel génétique permettant la production des autres protéines de la capsid est fournie par la co-infection avec un phage auxiliaire ou *helper* (M13K07). Le phagemide sera produit préférentiellement au phage auxiliaire car le génome de ce dernier porte une mutation dans le gène g2 qui diminue l'affinité de la protéine produite pour sa propre origine de réplication. Malheureusement, le phage helper produit de la protéine pIII

sauvage qui entrera en compétition avec la protéine pIII de fusion pour son incorporation dans la capsid du phage. Ceci crée une certaine hétérogénéité dans le nombre de protéines de fusion présentées à la surface des bactériophages. Ainsi, certains phages présenteront de 1 à 5 copies de la protéine de fusion alors que d'autres n'en présenteront aucune.

2.3. Principe général du phage display

Les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface des molécules telles que des peptides aléatoires, des fragments d'anticorps (Fab, Fv, ou scFv single chain Fv) (Winter, Griffiths et al. 1994) ou d'autres protéines (Fig. 30). Les phages recombinants sont ensuite sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible. Les banques de fragments d'anticorps sont le plus souvent sélectionnées sur des antigènes purifiés pour isoler des fragments d'anticorps avec de nouvelles spécificités. Tout d'abord, la cible est immobilisée sur un support, le plus couramment par adsorption passive. Puis, la banque de phages-anticorps est incubée avec cet antigène. Après de nombreux lavages, dans des conditions plus ou moins stringente, les phages fixés sont élués, le plus souvent de façon non spécifique par un choc de pH, puis isolés et amplifiés par infection de bactéries. Les phages amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible (Fig. 31). Après 1 ou plusieurs tours de sélection-amplification, les phages sélectionnés sont analysés et testés pour l'activité recherchée. La sélection étant effectuée *in vitro*, il devient possible de contrôler ce processus de sélection en faisant varier la quantité d'antigène, en modifiant les conditions de lavage (température, pH, concentration en sel, présence de compétiteurs) ou même en réalisant au préalable des contre sélections pour supprimer les anticorps présentant des spécificités non désirées.

Cette stratégie fondée sur la sélection est nettement plus puissante qu'une stratégie de criblage classique qui nécessite de nombreuses manipulations. Il est en effet possible de travailler directement sur 10^6 à 10^{10} molécules recombinantes différentes dans un volume réduit de quelques microlitres. De plus, l'association de la protéine exposée en surface (phénotype) avec son ADN codé par le phage (génotype) permet d'accéder rapidement aux séquences des molécules sélectionnées car l'ADN est directement isolé avec la protéine pour laquelle il code. Cette méthode est très efficace puisqu'il est possible de sélectionner un phage dont la fréquence était de $1/10^8$ dans la banque originale.

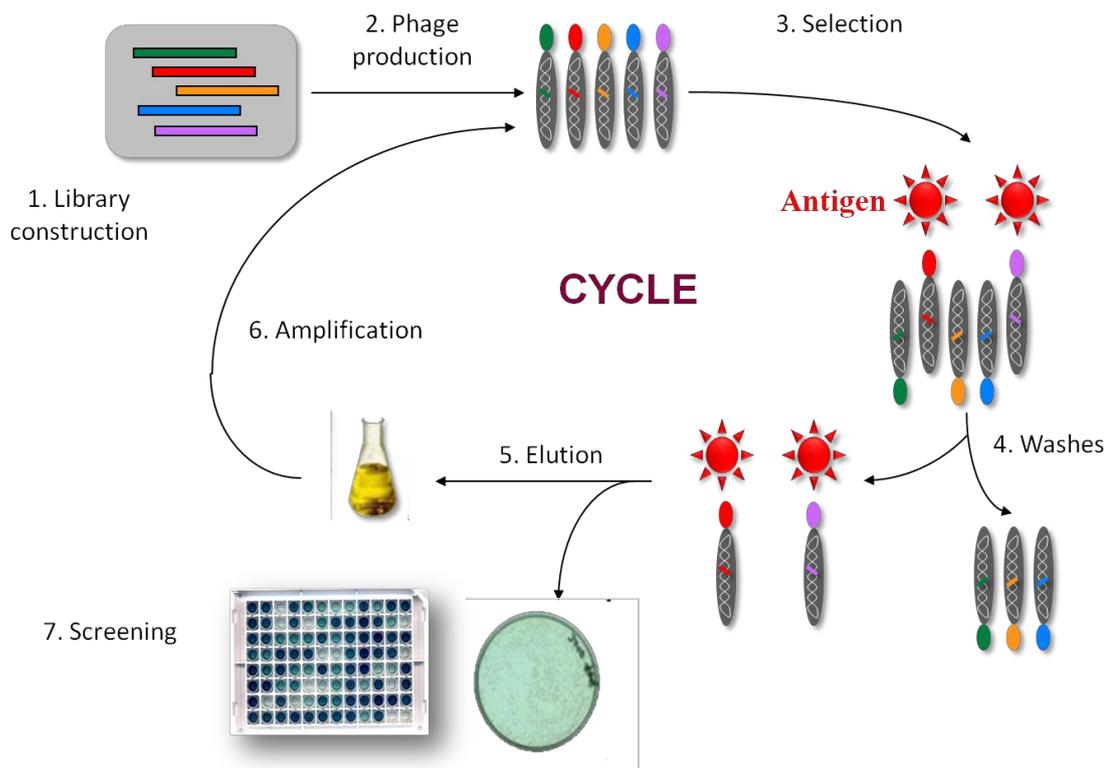


Figure 31 : Principe général du phage display.

2.4. Stratégies de sélection

Il est toujours possible d'éluer des phages après chaque tour de sélection, de les amplifier, et de recommencer. Il est, hélas, très fréquent d'être déçu : aucun clone issu des sélections ne reconnaît la cible désirée ; l'anticorps sous forme soluble ne se fixe plus sur la cible ; l'anticorps se fixe sur un cible purifiée, mais pas *dans un système cellulaire* ; il se fixe correctement à sa cible *in cellulo* mais ne présente aucune activité... De nombreux modes de sélections sophistiqués et plus adaptés à chaque problématique ont donc fait leur apparition.

2.4.1. Utilisation de différents phages helpers

Le protocole le plus courant est l'utilisation du phage helper M13KO7 pour la production des banques de phage. Mais, avec l'utilisation de ce phage helper, seuls 10 % de la totalité des phages produits présenteront de 1 à 5 copies de la protéine de fusion alors que tous les autres n'en présenteront aucune. L'utilisation de ce phage helper génère donc un bruit de

fond très important de phages qui pourront se lier au support ou à la cible de façon non spécifique pendant la sélection et qui seront ensuite amplifiés.

Une alternative à ce problème est l'utilisation du phage helper KM13 (Kristensen and Winter 1998). En effet, ce phage helper possède une protéine pIII mutée qui contient un site de clivage à la trypsine. De ce fait, en utilisant une digestion à la trypsine au cours de l'éluion, tous les phages ne présentant que des protéines pIII provenant du phage helper, donc sans protéine de fusion d'intérêt, perdront leur caractère infectieux par clivage de la pIII. Par cette méthode, tout le bruit de fond généré par des phages ne présentant aucune protéine fusionnée à la pIII sera éliminé pendant cette étape. De plus l'étiquette c-myc souvent ajoutée à l'extrémité C-terminale des fragments d'anticorps (pour une utilisation à posteriori en western blot ou ELISA) s'avère être elle aussi sensible à une digestion à la trypsine. De ce fait, la digestion à la trypsine permet donc d'éliminer le bruit de fond des phages non spécifiques et d'éluier les phages spécifiquement liés à la cible.

Une autre approche consiste en l'utilisation d'un phage helper qui ne contient pas le gène de la protéine pIII, comme par exemple l'hyperphage (Rondot, Koch et al. 2001). De ce fait, tous les phages produits possèdent à leur surface une pIII provenant du phagémide et fusionnée à la protéine d'intérêt, ce qui réduit considérablement le bruit de fond. De plus, l'effet de valence (5 pIII fusionnées) augmente le nombre de particules phagiques sélectionnées, ce qui peut être intéressant lorsque la protéine d'intérêt a une faible affinité pour sa cible.

2.4.2. Immobilisation orientée et conformationnelle de la cible

Les cibles d'intérêt sont généralement immobilisées sur un support par adsorption passive. Mais cette technique ne permet aucune orientation de la cible et peut entraîner une forte dénaturation de la protéine qui peut possiblement affecter les épitopes d'intérêts. Pour remédier à ce problème il existe de nombreuses stratégies permettant d'immobiliser la cible de façon orientée et/ou en conservant son intégrité conformationnelle. Une des possibilités est l'immobilisation via des étiquettes, par exemple la cible présente une étiquette poly histidine et peut donc ainsi être immobilisée sur un support de nickel ou de cobalt. Mais cette stratégie implique de posséder une cible fusionnée à une étiquette. Une autre possibilité consiste alors à utiliser le système biotine-streptavidine. La protéine cible est biotinylée puis ensuite immobilisée sur un support fonctionnalisé avec de la streptavidine, en évitant le phénomène d'adsorption mais sans conduire à une immobilisation orientée. Une troisième stratégie

possible consiste au couplage covalent d'une cible sur un support époxy. La réaction de liaison covalente va se faire entre les groupements amines de la cible et les groupements époxy du support. Par cette méthode, aucune modification préalable de la cible n'est nécessaire, la liaison établie est covalente (mais non orientée), et dans la grande majorité des cas observés au laboratoire, la protéine ainsi couplée conserve toute son intégrité conformationnelle.

2.4.3. *Stratégies d'élution spécifique*

De façon classique, en raison de la grande stabilité du phage filamenteux, des méthodes d'élution non spécifiques très stringentes telles qu'un choc extrême de pH, des conditions dénaturantes, un stress ionique ou encore la sonication peuvent être utilisées. Mais dans certains cas particuliers, il peut être judicieux d'utiliser des méthodes d'élution plus fines et moins drastiques. Par exemple, pour une élution plus spécifique, l'élution peut être réalisée par compétition avec des cibles libres ajoutées en solution. De ce fait, seuls les phages présentant une protéine reconnaissant la cible d'intérêt présente en solution seront élués. Une autre possibilité est de réaliser une élution grâce à un ligand compétiteur. La compétition pour la cible qui va se dérouler entre les phages et ce ligand compétiteur va permettre d'éluer les phages spécifiques. Toutefois, cette méthode comporte l'inconvénient de sélectionner préférentiellement les clones de faible affinité.

2.4.4. *Élimination des phages non désirés par déplétion*

Une méthode de déplétion peut être utilisée pour éliminer les phages non désirés de la banque utilisée pour la sélection. Pour minimiser l'enrichissement de phages ne reconnaissant pas le ou les épitopes d'intérêt, la banque de phage est donc mise en contact avec un échantillon non spécifique. Après incubation, tous les phages non fixés à cet échantillon sont récupérés pour réaliser la sélection sur l'échantillon spécifique. Cette stratégie de sélection est une méthode de plus en plus utilisée. Son efficacité sera discutée plus tard dans le manuscrit.

2.4.5. *Association affinité / infectiosité*

Le système SAP (*Selection and Amplification of Phage*) (Duenas and Borrebaeck 1994) ou SIP (*Selectively Infective Phage*) (Krebber, Spada et al. 1997) permet de coupler la

reconnaissance anticorps-antigène à l'infectiosité du phage. Les fragments d'anticorps exprimés à la surface de protéines pIII défectueuses sont sélectionnés sur une cible couplée à une pIII sauvage ou complémentaire. Seuls les phages porteurs d'anticorps liés à la cible-pIII sont infectieux et amplifiés dans *E. coli*.

Nous avons donc vu ici quelques stratégies possibles pour améliorer la technique du phage display. Ceci n'est pas une liste exhaustive, de nombreuses stratégies ont déjà été imaginées et la flexibilité du système phage display permet d'imaginer toutes sortes de modulations, qui ne feront qu'évoluer en même temps que les techniques disponibles.

2.5. Applications

Le phage display est donc une technologie puissante qui amène de nombreuses applications. Nous allons en voir ici quelques exemples.

2.5.1. Interactions protéines-protéines

Plus de 80% des protéines cellulaires agissent en complexe avec d'autres protéines et leurs interactions sont régulées par de nombreux mécanismes. Le phage display est utilisé dans de nombreuses études d'interactions protéine/protéine (Voss, Lettau et al. 2009 ; Caberoy, Zhou et al. 2010). Son utilisation, combinée à la mutagenèse combinatoire, fournit une méthode rapide pour identifier les résidus présents à l'interface d'interaction entre deux protéines. Des banques de peptides ont été utilisées pour identifier de nouveaux interactants de protéines. Par exemple, le phage display a été utilisé pour cartographier les interactions intracellulaires de domaines protéiques SH3 et PDZ (Kiewitz and Wolfes 1997; Fuh, Pisabarro et al. 2000). Les peptides sélectionnés spécifiquement pour leur affinité avec un domaine SH3 ont montré des séquences différentes des ligands naturels déjà connus. Les peptides sélectionnés peuvent ensuite être utilisés pour identifier, par comparaison avec la séquence du génome entier, des ligands potentiels de la protéine cible. Ceci fournit un outil efficace pour la caractérisation fonctionnelle des gènes identifiés par le séquençage du génome.

2.5.2. *Spécificité enzymatique et inhibition*

Le phage display est également utilisé en enzymologie pour déterminer la spécificité de substrat et développer des modulateurs des sites actifs ou allostériques d'une enzyme (Kehoe and Kay 2005; Diamond 2007). Cette méthode peut être utilisée pour étudier le mécanisme d'action d'enzymes mutantes (Vanwetswinkel, Avalle et al. 2000 ; Ponsard, Galleni et al. 2001 ; Verhaert, Beekwilder et al. 2002). Puisque les phages filamenteux sont résistants à de nombreuses protéases, ils ont été utilisés pour identifier les substrats de nombreuses protéases (Matthews and Wells 1993 ; Diamond 2007). Une autre application est de développer des inhibiteurs de site catalytique d'enzyme en criblant une banque de peptides ou une banque de mutants d'inhibiteurs déjà existants sur un cible enzymatique immobilisée (Hekim, Leinonen et al. 2006).

2.5.3. *Isolement d'anticorps*

Les anticorps sont des outils indispensables pour de nombreuses approches réalisées actuellement. Toutefois, la production de ces anticorps doit inévitablement passer par l'immunisation d'un animal et plusieurs facteurs tels que l'immunogénicité et la conservation de la séquence protéique détermineront la qualité (affinité et avidité) des anticorps obtenus. Le phage display avec des banques d'anticorps a été réalisé avec succès pour générer des anticorps spécifiques pouvant être utilisés dans de multiples applications comme la protéomique, la thérapie et l'analyse de processus intracellulaire (Bratkovic 2010). L'avantage majeur de l'utilisation du phage display pour l'isolement d'anticorps est la rapidité et la possibilité de travailler sans immuniser d'animaux. Les banques d'anticorps naïves naturelles ou synthétiques peuvent être utilisées contre de nombreux antigènes, incluant les molécules non immunogènes ainsi que les molécules toxiques ou très conservées au cours de l'évolution.

Cette approche a été très bien illustrée dans la sélection d'anticorps spécifiques de chacun des 20 domaines SH2 (*Src homology 2*) humains qui partagent une structure tridimensionnelle commune et 20 à 89% de similitudes dans leur séquence (Pershad, Pavlovic et al. 2010).

Le phage display est également utilisé pour l'isolement d'intrabodies, qui sont des anticorps dirigés contre des protéines intracellulaires. Les scFvs sont des protéines peu solubles dans l'environnement réducteur du cytoplasme ou du noyau. Pour résoudre ce

problème, des banques de scFv optimisées pour une bonne expression intracellulaire ont été utilisées pour sélectionner des intrabodies (Philibert, Stoessel et al. 2007; Cardinale and Biocca 2008). Les intrabodies sont un outil puissant pour visualiser ou modifier la fonction de cibles intracellulaires.

Le phage sélectionné contre une cible précise peut être stocké et utilisé à la demande pour générer des anticorps pour des applications thérapeutiques ou diagnostiques. Le phage display a été largement utilisé pour trouver des anticorps avec une activité anti tumorale ou anti pathogène. Une des approches concerne la sélection de banques contre une molécule surexprimée dans une tumeur ou une molécule spécifique d'un pathogène. Un anticorps spécifique d'une tumeur peut être utilisé en imagerie pour visualiser une tumeur ou pour délivrer des conjugués toxiques (toxines, cytokines, radioisotopes) pour éliminer le cancer de façon spécifique (Zhou and Marks 2009).

Une dernière application que nous pouvons citer concerne la neutralisation des virus. De nombreux virus mutent rapidement pour échapper au système immunitaire. Des anticorps à large spectre peuvent alors être sélectionnés en réalisant des sélections en changeant d'antigène à chaque tour de sélection pour sélectionner des anticorps reconnaissant un épitope conservé dans les différents mutants. Ce processus a permis la sélection d'anticorps dirigés contre le VIH avec une haute affinité et un large spectre d'action neutralisante (Zhang and Dimitrov 2009).

2.5.4. *Identification d'épitopes*

Le phage display est une méthode rapide et efficace pour cartographier l'épitope (*epitope mapping*) impliqué dans une interaction spécifique avec un anticorps. L'identification d'épitope est essentielle pour le développement diagnostique, thérapeutique et vaccinal. Des banques de peptides peuvent aider à identifier les résidus d'un épitope qui sont impliqués dans l'interaction avec l'anticorps. Puisque un épitope linéaire continu fait généralement 6 acides aminés, le phage display peut permettre de sélectionner les peptides qui s'unissent exactement avec la structure primaire de l'épitope (Geysen, Mason et al. 1988 ; Fack, Hugle-Dorr et al. 1997).

2.5.5. Récepteurs membranaires

Les protéines membranaires représentent environ un quart des protéines totales. Leurs rôles dans les mécanismes de transport et de signalisation en font des cibles évidentes pour des molécules thérapeutiques. Or la purification de ces protéines reste un exercice difficile qui nécessite l'utilisation de détergents pouvant altérer leur structure intrinsèque, et de ce fait rendre la sélection de ligand par phage display inefficace. Ceci peut être contourné en réalisant une sélection directement sur cellules. L'un des problèmes majeurs de ce type de sélection est le bruit de fond généré car bon nombre de phages se fixent à la surface membranaire. Une des stratégies couramment utilisée pour contrecarrer cette difficulté est de faire une étape de déplétion sur une population de cellules n'exprimant pas le récepteur désiré (voir la partie précédente). Même si cette technique reste difficile à maîtriser, elle reste extrêmement utile pour la sélection de ligands de protéines membranaires.

2.5.6. Sélection *in vivo*

En 1996 une nouvelle technique mise au point par Pasqualini et Ruoslahti a été publiée (Pasqualini and Ruoslahti 1996). Dans cet article, les auteurs identifient plusieurs ligands protéiques spécifiques de l'endothélium des reins et du cerveau après injection dans la circulation sanguine de souris d'une banque peptidique exposée à la surface de bactériophages. Cette technique appelée « phage display *in vivo* » est très proche des expériences de phage display classiques réalisées sur un antigène immobilisé. La répétition des tours de sélections et la récupération des phages fixés sur les organes d'intérêt les conduisent systématiquement à un enrichissement de phages exhibant à leur surface des peptides, ligands de récepteurs endothéliaux tissus spécifiques. Un des aspects clés de cette technique est la sélection à la fois négative et positive qui s'opère lors de la circulation des phages dans le sang. En effet, après l'injection, les phages vont rencontrer l'endothélium de la majorité des organes et s'y fixer en fonction de l'affinité du peptide qu'ils portent (sélection négative). La sélection positive s'effectue alors car seuls ceux fixés sur l'organe étudié seront récupérés et réinjectés. Au jour d'aujourd'hui, le phage display *in vivo* a permis d'identifier un nombre impressionnant de peptides ciblant par exemple l'endothélium d'organes (Kolonin, Pasqualini et al. 2001) ou de tumeurs (Essler and Ruoslahti 2002 ; Joyce, Laakkonen et al. 2003). Un autre point fort de la technique réside dans le fait que l'on sélectionne d'emblée des ligands présentant un comportement intéressant *in vivo*.

2.6. Les autres systèmes de sélection

Suite au succès du phage display, d'autres méthodes de sélection *in vitro* furent développées. Par exemple, le yeast display (expression à la surface de levure) permet d'obtenir le même lien physique entre le fragment d'anticorps et son gène tout en bénéficiant des possibilités d'expression dans un système eucaryote plus adapté à l'expression de fragments d'anticorps (Shibasaki, Maeda et al. 2009). Mais d'autres méthodes ont permis de lever une limite du phage display. En effet, la création de banques de phage display exprimant un très grand nombre d'anticorps nécessaire pour une sélection des meilleurs anticorps comprend des étapes de clonage et de transformation d'*E. coli*, ce qui limite la taille des banques à la dizaine de milliard de clones. D'autres méthodes se sont affranchies d'une partie de ces étapes, telles que le ribosome display (Yan and Xu 2006) ou une technique similaire, le mRNA display, qui consistent, dans les deux cas, à obtenir *in vitro* un complexe stable entre l'ARN messager d'un fragment d'anticorps et de la chaîne polypeptidique correspondante (Wang and Liu 2011). La sélection de ce complexe par affinité permet ainsi l'amplification du gène d'intérêt par transcription inverse et PCR (RT-PCR). Ces techniques ne nécessitant pas de transformation de cellules vivantes, elles permettent d'obtenir sans effort des banques 100 à 1 000 fois plus grandes, mais restent plus délicates à mettre en œuvre que celle du phage display.

Entr'acte

Objectifs de la thèse

Nous avons vu dans l'introduction l'état de l'art en ce qui concerne le diagnostic du cancer du sein et les techniques qui y sont associées. Nous pouvons alors conclure que le diagnostic précoce et précis du cancer du sein reste un enjeu majeur pour un traitement plus efficace. En effet, un cancer du sein primaire est diagnostiqué par palpation du sein. Puis, une mammographie et une biopsie de la tumeur sont nécessaires pour confirmer le diagnostic. Cette approche est efficace puisque un programme national de dépistage réalisé depuis 17 ans a permis de diminuer de 30 % la mortalité par ce cancer. Mais ces méthodes sont invasives, coûteuses et peu adaptées à un suivi de routine dans l'évaluation du risque de rechute et de la réponse au traitement. De plus, il existe une grande variabilité de réponse au traitement entre patientes liée à la grande hétérogénéité des tumeurs mammaires.

Pour le diagnostic de métastase, il n'existe actuellement aucune stratégie validée de recherche systématique de métastases dans le cancer du sein, en dépit des nombreuses études réalisées. En pratique, bien que de nombreux marqueurs circulants aient été identifiés, aucun d'entre eux n'est recommandé pour le dépistage des cancers mammaires dans la population générale ni pour une utilisation diagnostique en cas d'anomalie mammaire. La faible sensibilité de ces marqueurs aux stades précoces de la maladie et leur manque de spécificité ne permet pas leur utilisation pour le diagnostic du cancer du sein. De plus, leur nombre et leur pertinence sont encore insuffisants pour que leur détection suffise à établir un diagnostic fiable. Or, même si à l'heure actuelle, aucun traitement efficace n'existe pour soigner un cancer du sein métastatique, son dépistage le plus précoce reste primordial pour permettre un allongement significatif de la durée de vie de la patiente.

Il est donc nécessaire d'élaborer de nouvelles méthodes d'analyses qui permettront un suivi plus efficace du cancer du sein. Une analyse plus précise des caractéristiques moléculaires d'une tumeur primaire pourrait conduire à une médecine personnalisée, un traitement et un suivi plus efficaces. Une détection efficace de biomarqueurs sériques serait un moyen indispensable pour diagnostiquer précocement un cancer métastatique et donc espérer pouvoir le soigner un jour. La détection d'antigènes tumoraux pour la détection de

cellules tumorales circulantes est également une approche pleine d'avenir. Pour cela, des méthodes d'analyses simples et spécifiques sont nécessaires. En effet, comme nous l'avons vu, une des conditions primordiales en clinique est la spécificité. Elle doit être suffisante pour qu'un diagnostic puisse être établi. Pour cela, l'analyse d'un grand nombre d'antigènes est nécessaire. Plus ils seront nombreux, spécifiques et pertinents, plus le diagnostic sera précis, efficace et donc profitable. La deuxième condition primordiale pour une analyse diagnostique est l'utilisation de faibles quantités d'échantillon. Le concept de puce à anticorps pourrait répondre à ces contraintes en permettant de réaliser des dosages immunologiques multiplexés à partir d'une très faible quantité d'échantillons.

Le challenge actuel est donc de découvrir d'éventuels nouveaux biomarqueurs pour l'analyse du cancer du sein puis d'utiliser les anticorps correspondants pour construire des outils diagnostiques. La recherche de nouveaux biomarqueurs ou antigènes protéiques est principalement réalisée par différentes techniques de spectrométrie de masse pour identifier les protéines ou réaliser le *profiling* d'un échantillon. Les limitations de ces approches sont principalement la complexité, la reproductibilité et la présence de protéines majoritaires non spécifiques gênant la détection de nouveaux biomarqueurs potentiels généralement peu abondants. En ce qui concerne les anticorps nécessaires pour réaliser un test immunologique, ces derniers sont principalement des anticorps monoclonaux. Mais leur isolement est difficile et fastidieux, leur production est coûteuse et les immobiliser de façon efficace sur un support reste une limitation.

L'objectif de ma thèse a été d'élaborer une stratégie qui permettrait simultanément la découverte de biomarqueurs spécifiques et l'isolement des anticorps correspondants nécessaires pour réaliser différentes approches biotechnologiques comme une puce pour le diagnostic et le suivi du cancer du sein. Pour répondre à cette demande, un outil innovant est l'utilisation des fragments d'anticorps de camélidés, les sdAbs. Toutes les propriétés des sdAbs en font un outil adapté pour une utilisation en protéomique, en diagnostic et en thérapie. La construction de banques d'anticorps simple domaine à partir de lamas immunisés suivie de l'obtention de nouveaux anticorps par sélection *in vitro* comme le phage display est rapide et efficace. Après sélection, les sdAbs peuvent être rapidement criblés et caractérisés par ELISA et par immunohistochimie. Finalement, les sdAbs pertinents peuvent être très efficacement utilisés dans de nombreuses applications comme l'élaboration d'une puce diagnostique, un essai d'enrichissement de cellules rares ou encore pour des approches d'imageries. La détermination de l'antigène reconnu par ces fragments d'anticorps peut être

réalisée par immunoprécipitation et analyse en spectrométrie de masse. Cette approche permet donc d'analyser un échantillon complexe en rétrécissant le champ d'analyse.

Dans le premier volet, nous allons donc voir la partie du travail qui a consisté à développer une méthode efficace et simple d'immobilisation des sdAbs permettant l'analyse de différents types d'échantillons et applicable sur différents supports. Nous avons pour cela mis aux point différentes méthodes d'immobilisation de sdAbs contenus dans du lysat bactérien brut sur différents types de support. La stratégie choisie consiste en une biotinylation *in vivo* des sdAbs pour permettre une immobilisation sur un support recouvert de streptavidine et une détection en sandwich par un deuxième anticorps pour une plus grande spécificité et sensibilité. Cette stratégie est applicable sur différents types de support et permet la détection de 10 pM (2 ng/ml) d'ACE dans du sérum de patients. Cette limite de détection est supérieure au seuil d'ACE considéré comme négatif chez un patient (5 ng/ml) démontrant que ce système d'analyse de sérum est sensible et spécifique.

Après la mise au point de l'immobilisation des sdAbs pour l'élaboration d'une puce à anticorps, il a donc été primordial d'isoler de nouveaux sdAbs pertinents pour le diagnostic du cancer du sein. Ceci est présenté dans le deuxième volet des résultats. Il nous a donc fallu réussir à isoler un panel de différents sdAbs reconnaissant des antigènes spécifiques différentiellement exprimés dans les cancers du sein. Pour cela, des lamas ont été immunisés avec des biopsies de cancer du sein. Après la construction de banques de sdAbs de grande diversité, des sélections par phage display ont été réalisées sur protéines totales de lysats de biopsie et sur cellules intactes de lignées humaines de cancer du sein. De nombreuses sélections ont été réalisées et nous ont permis d'élaborer une nouvelle stratégie de sélection efficace, dénommée sélection masquée, pour isoler des anticorps spécifiques de protéines cancéreuses, que ce soit sur lysat protéique ou sur cellules entières. La caractérisation fine des anticorps et de leur spécificité a été réalisée par différents tests immunologiques comme des ELISA, de la cytométrie de flux ou encore de l'immunohistochimie. Ensuite, dans le but de prouver l'universalité de la sélection masquée, nous avons isolé des anticorps spécifiquement dirigés contre une partie précise d'une protéine recombinante. Nous avons aussi mis au point un protocole n'utilisant pas d'antigène purifié dans lequel des cellules transfectées sont utilisées pour les étapes d'immunisation, de sélection et de criblage. Dans ces différentes conditions, notre stratégie de sélection masquée a encore prouvé son efficacité et sa supériorité par rapport aux techniques déjà existantes.

Après l'isolement de ces anticorps spécifiques, il était primordial de montrer dans une troisième partie, leur capacité à être utilisés de façon rapide et efficace pour le diagnostic du cancer du sein. Tout d'abord, nous avons montré la possibilité d'identifier les antigènes reconnus par ces sdAbs. La disponibilité de l'anticorps a permis de réaliser des immunoprécipitations permettant de purifier et d'identifier les antigènes par spectrométrie de masse. Ensuite, nous avons pu montrer une utilisation directe des différents anticorps isolés dans différentes applications telles que la réalisation d'une puce à sdAbs pour l'analyse multiplexée d'antigènes dans un échantillon complexe et l'enrichissement de cellules rares par cytométrie de flux.

Dans le dernier volet, nous verrons comment il est possible d'optimiser un sdAb pour son couplage à une nanoparticule par l'ajout d'un groupe réactif à l'extrémité C-terminale de la protéine, diminuant ainsi fortement le risque d'altérer les résidus impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. Nous verrons comment des sdAbs peuvent très facilement être couplés à des nanoparticules telles que les Quantum Dots, fluorophores tout à fait originaux et efficaces, pour différentes applications telles que la cytométrie de flux ou l'immunofluorescence sur coupe de tissus.

Résultats et Discussions

Partie I :

L'immobilisation des anticorps simple domaine

1. Introduction : une immobilisation forte et orientée

Nous avons vu au cours de l'introduction que le point critique de la fabrication d'une puce à anticorps est la fonctionnalisation de cette dernière. En effet, la liaison de l'anticorps de capture sur le support doit être optimale en termes de force de liaison et d'orientation afin de permettre une reconnaissance efficace de l'antigène. La grande majorité des puces à anticorps utilisent des anticorps monoclonaux, mais leur immobilisation est complexe et souvent peu efficace. Leur utilisation est donc faiblement adaptée à la réalisation d'une puce à haute densité. Une alternative est l'utilisation d'anticorps recombinants. Les anticorps recombinants classiques, Fab et scFv, sont des outils plus faciles à isoler grâce aux techniques de sélection *in vitro*, mais leur production reste fastidieuse et ils sont souvent très peu stables. Nous avons donc choisi d'utiliser un nouveau format d'anticorps, les simples domaines d'anticorps (sdAbs) de lama. Toutes les caractéristiques de ces anticorps en termes d'isolement, de production et de stabilité en font un outil idéal pour réaliser une puce à anticorps.

Pour la réalisation d'une puce pour le diagnostic du cancer du sein, le premier objectif a donc été de mettre au point un système d'immobilisation des sdAbs, simple, rapide, efficace et applicable sur différents types de support. L'efficacité de l'immobilisation d'un anticorps dépend de deux paramètres primordiaux : la force de l'interaction entre l'anticorps et son support et l'orientation de l'anticorps immobilisé.

Une première possibilité envisagée a été d'utiliser le système classique de biotinylation de l'anticorps pour une immobilisation sur un support recouvert de streptavidine. La méthode la plus couramment utilisée est la biotinylation chimique *in vitro*, basée sur une réaction se produisant au niveau des amines primaires, généralement sur les lysines exposées à la surface de la protéine. Cette technique nécessite cependant de purifier chaque anticorps, peut dénaturer ce dernier, et ne conduit pas à une orientation particulière par rapport au support. Nous avons donc choisi une méthode plus spécifique qui est la biotinylation enzymatique *in vivo*. En effet, la biotinylation des sdAbs peut être réalisée *in vivo* en fusionnant l'extrémité C-terminale de l'anticorps avec une étiquette de 15 acides aminés (avitag) reconnue par une

enzyme présente chez *E. coli* nommée BirA. Cette enzyme biotinylyse spécifiquement *in vivo* une lysine unique présente sur l'avitag. La protéine produite avec ce système possède donc une seule biotine sur son avitag. Ce système permet une immobilisation très forte grâce à l'interaction biotine-streptavidine et orientée grâce à une biotinylation site-spécifique sur l'extrémité C-terminale de l'anticorps.

La deuxième approche a consisté à utiliser l'interaction entre une étiquette, c-myc, et un anticorps reconnaissant cette étiquette, anti c-myc (mAb 9E10), immobilisé sur le support. Cependant, l'affinité de cet anticorps pour son étiquette n'est pas suffisante pour permettre une interaction forte. Pour remédier à ce problème, nous avons choisi de réaliser un système de multi-étiquette. En effet nous avons fusionné trois étiquettes c-myc à l'extrémité C-terminale de nos sdAbs. Grâce à la présence de cette multi étiquette C-terminale, un effet d'avidité permet d'obtenir une interaction forte et orientée des sdAbs sur le support.

Nous avons ensuite analysé la sensibilité de nos systèmes et démontré leur efficacité sur différents types de supports. Les essais ont été réalisés sur billes pour modéliser la réalisation de puces en phase liquide, et sur lame de nitrocellulose pour la réalisation de puces en phase solide. Nous avons ensuite testé notre système d'immobilisation des sdAbs biotinylés *in vivo* dans des conditions physiologiques en analysant du sérum de patients.

L'ensemble de ces résultats a permis de réaliser une publication présentée dans la suite de cette partie.

2. Article 1

Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysate for high-throughput compatible cost-effective antibody arrays generation

Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation†

Klervi Even-Desrumeaux, Daniel Baty and Patrick Chames*

Received 30th April 2010, Accepted 5th August 2010

DOI: 10.1039/c005279e

Antibody microarrays are among the novel class of rapidly emerging proteomic technologies that will allow us to efficiently perform specific diagnoses and proteomic analysis. Recombinant antibody fragments are especially suited for this approach but their stability is often a limiting factor. Camelids produce functional antibodies devoid of light chains (HCAbs) of which the single N-terminal domain is fully capable of antigen binding. When produced as an independent domain, these so-called single domain antibody fragments (sdAbs) have several advantages for biotechnological applications thanks to their unique properties of size (15 kDa), stability, solubility, and expression yield. These features should allow sdAbs to outperform other antibody formats in a number of applications, notably as capture molecules for antibody arrays. In this study, we have produced antibody microarrays using direct and oriented immobilization of sdAbs, produced in crude bacterial lysates, to generate a proof-of-principle of a high-throughput compatible array design. Several sdAb immobilization strategies have been explored. Immobilization of *in vivo* biotinylated sdAbs by direct spotting of bacterial lysate on streptavidin and sandwich detection was developed to achieve high sensitivity and specificity, whereas immobilization of “multi-tagged” sdAbs *via* anti-tag antibodies and a direct labeled sample detection strategy was optimized for the design of high-density antibody arrays for high-throughput proteomics and identification of potential biomarkers.

Introduction

The basic concept of microarray technology was initiated by the model of Ekins^{1,2} stating that “microspot” of elements should be able to detect analytes with a higher sensitivity than conventional immunoassays. On this basis, DNA microarray rapidly became the first application of this model and several well established approaches are now available to monitor mRNA abundance from small amounts of materials. However, this approach is biased by the lack of relationship between mRNA and protein abundance, and is not sufficient to understand complex cellular networks. Considerable efforts are being undertaken to develop a comparable technology for the analysis of protein levels, modifications and interactions. The development of methods for the global analysis of the protein of the cell is still in its early stage. Currently, the dominant technology for profiling of protein expression is two-dimensional (2D) gel electrophoresis.³ This procedure is time-consuming and expensive and reproducibility is often an issue. There is a challenge to replace gels with alternative methods of protein expression analysis, including microarrays. Three types of protein microarrays are currently used: analytical, functional and reverse phase microarrays.⁴ Analytical

microarrays are typically used to profile a complex mixture of proteins in order to measure binding affinities, specificities and protein expression levels. In this technique, monoclonal antibodies or derived formats such as Fab (Fragment Antigen Binding), scFv (single chain variable Fragment) but also aptamers and affibodies⁵ are arrayed on a support and the array is probed with a protein solution. Antibody microarrays, pioneered by MacBeath and Schreiber⁶ and Haab *et al.*,⁷ are the most common analytical microarrays. This type of microarray will provide a new means to perform differential protein expression profiling of healthy *vs.* diseased samples. They are expected to play a key role within disease diagnostics, biomarkers discovery and drug target identification. The ability to monitor multiple protein interactions in parallel has many advantages, such as saving of time, cost and sample consumption, especially if assays are miniaturized. Most array-based strategies use sandwich assays that can be highly sensitive and specific, but this design is not compatible with high-density arrays. A complementary technology is label-based detection, affording high levels of multiplexing and high density, at the expense of specificity and sensitivity.⁸

To perform global proteomic analysis, high demands will be placed upon the choice of catcher proteins. The specificity of the probes is also a critical feature since analytes must be specifically detected in heterogeneous mixtures containing more than 10 000 different irrelevant proteins. Currently, mainly low-density antibody microarrays (on planar substrate or on bead) have successfully been designed and developed.^{9–13} In contrast to nucleic acids, antibodies and proteins in general

INSERM U624, 163 avenue de Luminy-case 915,
13288 Marseille Cedex 09, France.
E-mail: patrick.chames@inserm.fr; Fax: +33 4 91826083;
Tel: +33 4 91828833

† Electronic supplementary information (ESI) available: Fig. S1–Scheme of the various assays. See DOI: 10.1039/c005279e

are chemically and structurally much more complex, heterogeneous, and often unpredictable, regarding their interaction profiles. Therefore, it is difficult to define general protein detection and immobilization strategies that do not discriminate between proteins. It is well accepted that oriented immobilization strategies improve array performances^{14–16} but most described strategies involve multiple steps, including purification and are not compatible with high-throughput array generation.

Recombinant antibody libraries such as scFv or Fab, providing numerous probes based on a single scaffold with similar biological properties, will display significant advantages. But, recombinant antibody formats such as scFv are often unstable¹⁷ and produced with a poor yield. In 1993, Hamers-Casterman *et al.*¹⁸ discovered that the serum of camels, dromedaries and llamas contain a unique type of antibody devoid of light chains. Camelids produce functional antibodies devoid of light chains (HCABs) and CH1 domains, of which the single N-terminal domain is fully capable of antigen binding. When they are recombinantly produced, these single domain antibody fragments (sdAbs) have several advantages for biotechnological applications thanks to their unique properties of size (15 kDa), stability even without disulfide bond formation,¹⁹ solubility, and expression yield.²⁰ These features should lead to a number of applications where sdAb should outperform other antibody formats, notably as capture molecules for antibody arrays.

In this study, we have generated a proof-of-principle for several immobilization strategies of sdAbs contained in crude bacterial lysates, namely immobilization of *in vivo* biotinylated sdAbs by direct spotting of bacterial lysate on streptavidin, or multi-tagged sdAbs on anti-tag antibodies. By use of these immobilization strategies, we compared different detection methods, either by sandwich or label-based detection. These methods allow the specific and sensitive detection of subnanomolar antigen concentration without using signal amplification in model systems with pure antigen as well as crude patient sera.

Materials and methods

Proteins and serum sample

Anti-HIV-1 Nef sdAb (manuscript in preparation and ref. 21) and anti-CEA sdAb²² were selected from immunized sdAb libraries. pET vectors were used to produce *in vivo* biotinylated sdAbs. All sdAbs produced in this vector carry a C-terminal his₆-tag, with or without AvitagTM (GLNDIFEAQKIEWHE) upstream. To generate plasmids coding for sdAb-avitagTM-his₆, sdAb-tags was first amplified from pET-sdAbaNef-his₆ using primers birA6hrev (TCAGCAAGCTTAGGATCCGTGATGATGATGGTGGTGTTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTTCAGACCTGCGGCCGCTGAGGAGACAG) and seqT7 (TAATACGACTCACTATAGGG). Purified PCR products were digested with NcoI and BamHI and followed by gel purification and ligation into vector pET-sdAbaNef-his₆ which had been previously digested with the same restriction enzymes.

pJF55 vector was used for the production of sdAbs fused to c-myc tag. All sdAbs produced in this vector contain one, three, or no C-terminal myc-tags (EQKLISEEDL), followed by a his₆-tag. Vector pJF55-trimyc-his₆ was generated by overlapping PCR using primers trimycfor (ACCGTCTCC-TCAGCGGCCGCAGAACAGAACTGATCTCTGAAGA-GGACCTGAACGGTGAGCAGAAGCTCATTTCGGAGG) and trimycrev (CGCCAAAACAGAAGCTTTTAGTTGAG-GTCCTCTTCGCTGATCAATTTTTGTTTCGCCATTCAAA-TCTTCCTCGGAAATGAGCTTCTGC). Then, the purified PCR product was digested with NotI and HindIII, gel-purified and cloned into vector pJFsdAb-cmyc-his₆, that had been digested with the corresponding restriction enzymes. All constructs were verified by nucleotide sequencing.

Patient sera were kindly provided by Pr. J. H. Cohen, (Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims). Concentrations of soluble CEA in patient sera varied between 150 and 750 ng ml⁻¹ while CEA negative sera have a concentration of CEA lower than 5 ng ml⁻¹.

In vitro biotinylation

The *in vitro* biotinylation of proteins was performed using Ez-link micro NMHS-PEO4-biotinylation kit (Perbio science) following the recommendation of the manufacturer.

Labeling with Alexa488

The labeling of Nef with Alexa488 was performed using Alexa Fluor 488 Microscale Protein Labeling kit (Invitrogen) following the recommendation of the manufacturer, to obtain a degree of labeling (DOL) of Nef of around 3 Alexa per molecule.

Production and purification of sdAbs

Vectors pET and pJF containing different sdAbs were transformed in BI21DE3 and DH5 α strain respectively. Cells containing the plasmid were inoculated in 10 ml of 2YT medium (bactotryptone 16 g l⁻¹, yeast extract 10 g l⁻¹, NaCl 85 mM) supplemented with ampicillin (100 μ g ml⁻¹) and glucose (2%). Cells were grown overnight at 37 °C (250 rpm). Then cells were diluted to obtain an OD₆₀₀ of 0.1 in 400 ml of 2YT medium supplemented with ampicillin (100 μ g ml⁻¹) and cultures were grown until the OD₆₀₀ reached 0.5, when sdAb expression was induced by the addition of 0.1 mM IPTG (isopropyl-h-D-thiogalactopyranoside) at 30 °C (250 rpm) for 20 h. For *in vivo* biotinylated sdAbs, bacteria were co-transformed with pBir vector (Avidity, Colorado) and the culture medium was supplemented with chloramphenicol (50 μ g mL⁻¹) during production. Fifty μ M biotin was added during the induction.

Cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm for 10 min at 4 °C. For periplasmic purification, the cell pellet was suspended in 4 mL of cold TES buffer (0.2 M Tris/HCl, pH 8.0; 0.5 mM EDTA; 0.5 M sucrose), and 160 μ L lysozyme (10 mg mL⁻¹) in TES buffer was added. Cells were subjected to osmotic shock by the addition of 16 mL of cold TES diluted 1/2 with cold H₂O. After 30 min of incubation on ice, the suspension was centrifuged at 4000 rpm for 40 min at 4 °C. The supernatant was incubated with 150 μ L DNaseI

(10 mg mL⁻¹) and MgCl₂ (5 mM final) for 30 min at room temperature. The solution was dialyzed against 50 mM sodium acetate pH 7.0, 0.1 M NaCl, for 16 h at 4 °C.

For cytoplasmic purification, the cell pellet was frozen for 20 min at -80 °C and lysed by 20 ml of bugbuster (Novagen) for 20 min with low shaking.

All sdAbs were purified by affinity chromatography on Talon™ metal affinity resin (Clontech). Bound molecules were eluted with 250 mM imidazole, and proteins were concentrated in PBS by ultrafiltration with Amicon Ultra 5000 MWCO (Millipore, Billerica, MA, USA) and stored at -20 °C. Their degree of purity was evaluated by SDS-PAGE analysis and protein concentration (average of 5 mg mL⁻¹) was determined spectrophotometrically using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Production of sdAb-containing crude bacterial lysates

Vectors pET and pJF containing different sdAbs were transformed in BL21DE3 and DH5 α strain respectively. Transformed cells were inoculated in 96 well plates containing 150 μ l/well of 2YT medium supplemented with ampicillin (100 μ g mL⁻¹). Cells were grown until OD₆₀₀ reached 0.5 and incubated for 3 h at 37 °C after induction using 0.1 mM IPTG. For *in vivo* biotinylated sdAbs, bacteria were co-transformed with pBir vector and the culture medium was supplemented with chloramphenicol (50 μ g mL⁻¹) during production and 50 μ M of biotin was added during induction. After production, plates were centrifuged at 1700 rpm for 10 min and pellets were lysed with 30 μ l of bugbuster for 20 min with low shaking. Plates were stored at -20 °C.

Cell lines

MC38-CEA and MC38²³ are a kind gift of A. Pelegrin. Cells lines were cultured in DMEM complemented with 10% (v/v) fetal calf serum at 37 °C in a humidified atmosphere and with 5% CO₂. MC38-CEA culture medium was additionally complemented with 0.5 mg mL⁻¹ of geneticin.

Flow cytometry analysis

Experiments were performed on ice with rocking in 1% BSA PBS. Typically, 2 \times 10⁵ cells resuspended in 50 μ l were distributed in a 96-well microtiter plate, and incubated for 1 h with various concentrations (500 to 0.00005 nM) of anti-CEA sdAb produced in the cytoplasm or periplasm of bacteria. After washing, binders were detected with anti-his₆ mAb (Novagen) (1:1000). Washed cells were labeled with FITC conjugated anti-mouse antibody (Jackson) (1:60). Fluorescence was measured using a FACSCalibur™ (Becton and Dickinson) and results were analysed with the cellquest™ software. Negative (secondary antibody only) controls were carried out.

ELISA and slide assay

Activity of cytoplasmic and periplasmic sdAbs. Streptavidin plates (Thermo scientific) were blocked with 5% milk-PBS (MPBS) for two hours at RT. Fifty μ l/well of biotinylated Nef at 5 nM in 2% MPBS were incubated overnight at 4 °C. Wells

were washed and incubated for 1h at RT with 50 μ l of 2% MPBS containing various concentrations (500 to 0.00005 nM) of anti-Nef sdAb produced in the cytoplasm or periplasm of bacteria. After three washes with PBS, plates were incubated with 9E10 mAb (against c-myc) (santa cruz biotechnology) (1 μ g mL⁻¹) in 2% MPBS for one hour at RT. Following three washes with PBS, a goat anti-mouse HRP-conjugated mAb (Jackson) (0.16 μ g mL⁻¹ in 2% MPBS) was incubated for one hour at RT. After three washes in PBS, bound secondary antibodies were detected using ABTS. Coloration was followed at 405 nm.

Immobilization of sdAbs biotinylated. Streptavidin plates (Thermo scientific), streptavidin beads (Invitrogen), or nitrocellulose slides (Sciencetec) coated with streptavidin overnight at 4 °C (10 μ g mL⁻¹) were blocked with 5% MPBS for two hours at RT. SdAbs were diluted in 50 μ L of 2% MPBS and incubated overnight at 4 °C in a streptavidin plate and in a plate containing beads. SdAbs containing bacterial lysate diluted 1/4 in 2% MPBS were spotted and slides were dried for one hour at RT. Wells and slides were incubated with the sample (Nef or serum) in 2% MPBS for one hour at RT. After three washes with PBS, the plates and slides were incubated with primary antibody (anti-Nef mouse mAb (kind gift of Y. Collette, Marseille) 1:3000 or anti-CEA 35A7 antibody 2 μ g mL⁻¹, (kind gift of A. Pelegrin, Montpellier)) in 2% MPBS for one hour at RT. Following three washes with PBS, a goat anti-mouse HRP (Jackson) (0.16 μ g mL⁻¹) or Alexa488-conjugated mAb for bead assay or Alexa680-conjugated mAb for slide assay (Invitrogen) (4 μ g mL⁻¹) was incubated in 2% MPBS for one hour at RT. After three washes in PBS, the plate with HRP labeled mAb was colorimetrically detected at 405 nm using ABTS substrate (Sigma), the plate with Alexa labeled mAb was detected on Tristar reader (Berthold technologies) and the slides with Alexa labeled mAb were read on an Odyssey infrared imaging system (Licor).

Immobilization of trimyc-tagged sdAbs. Protein G beads or epoxy beads (Invitrogen), or nitrocellulose slides (Sciencetec) were incubated with 9E10 mAb (anti c-myc mAb, Santa-Cruz, sc-40) (1 μ g mL⁻¹ in PBS) for 1h at RT for protein G beads, 48h at 4 °C for epoxy beads, ON at 4 °C for slides and blocked with 5% MPBS for two hours at RT. SdAbs, either pure or contained in crude bacterial lysate were diluted in 2% MPBS and incubated for 1h at RT in the plate containing beads. SdAbs containing bacterial lysate diluted 1/4 in 2% MPBS were spotted and slides were dry after one hour at RT. After three washes with PBS, the plates and slides were incubated with biotinylated Nef in 2% MPBS for one hour at RT. After 3 washes with PBS, plates were incubated with HRP-conjugated streptavidin (Jackson) (1 μ g mL⁻¹) and slides with Alexa680-conjugated streptavidin (Invitrogen) (4 μ g mL⁻¹). Following 3 washes in PBS, ABTS substrate (sigma) was added on plates and color development was followed at 405 nm and slides with Alexa labeled streptavidin were read on an Odyssey infrared imaging system (Licor).

Results

1. Domain antibodies can be efficiently expressed in *E. coli* cytoplasm

Libraries of recombinant antibody fragments are a rich source of capture reagents. However, because they require disulfide bond formation, most fragments such as Fab or scFv fragments are produced in the periplasmic space of *E. coli*, an oxidizing environment favoring a correct folding of these fragments. In contrast, single domain antibodies are characterized by a very high solubility and stability that should allow them to fold properly in reducing environments such as the *E. coli* cytoplasm. To check this hypothesis, two model sdAbs (targeting Nef from HIV-1²¹ or human carcinoembryonic antigens (CEA))²² were produced in *E. coli* fused or not to a signal sequence, and purified from the periplasmic or cytoplasmic extract, respectively, and purified by metal affinity chromatography. As for most sdAbs, high production yields (10–30 mg L⁻¹) were obtained. Gel filtration analysis showed that only the monomer format was produced (data not shown). Both versions of anti-CEA sdAbs were shown to perform similarly by flow cytometry on MC38-CEA cells, a murine colon carcinoma cell line transfected with human CEA cDNA²³ (Fig. 1A) (see Fig. S1 for a schematic representation of the various assays used in this work, ESI†) and similar results were obtained with both versions of the anti-Nef sdAb by ELISA (Fig. 1B), demonstrating that sdAbs can be efficiently produced in an active form in the cytoplasm of *E. coli*.

2. Oriented sdAb immobilization

Beside its efficiency, cytoplasmic sdAb production further offers the possibility to biotinylate sdAbs *in vivo* using a C-terminal fusion with a 15 amino acids tag (avitag) recognized by the *E. coli* BirA enzyme. The resulting molecules possess a single biotin molecule coupled to a single lysine present on the avitag, which allows a near covalent and oriented immobilization through binding to streptavidin. In contrast, *in vitro* biotinylation can lead to inactivation of the protein and does not allow oriented immobilization. To test this hypothesis, the anti-Nef sdAb was fused to the avitag, biotinylated *in vivo* and purified. For comparison, the anti-Nef sdAb was purified and biotinylated *in vitro* using a primary amine coupling strategy. Biotinylation efficiency was checked by incubation over streptavidin beads. Up to 95% of *in vivo* biotinylated sdAbs and 80% of *in vitro* biotinylated sdAbs could be captured on beads, demonstrating an efficient biotinylation (data not shown). As shown in Fig. 2A, the *in vivo* biotinylated sdAb had to be diluted tenfold compared to the chemically biotinylated version to yield similar results, suggesting that *in vivo* biotinylation preserves the activity of the sdAb and allows an optimal orientation.

However, this strategy precludes the use of the streptavidin: biotin system for detection of bound molecules, a useful strategy for high throughput approaches. As an alternative, we decided to immobilize sdAbs *via* interaction between a c-terminal c-myc tag (EQKLISEEDLN) and mAb 9E10, a commercially available murine IgG binding to this peptidic sequence. Three tandem repetitions of the tag (named trimyc tag) were also fused to the sdAb C-terminus to increase the

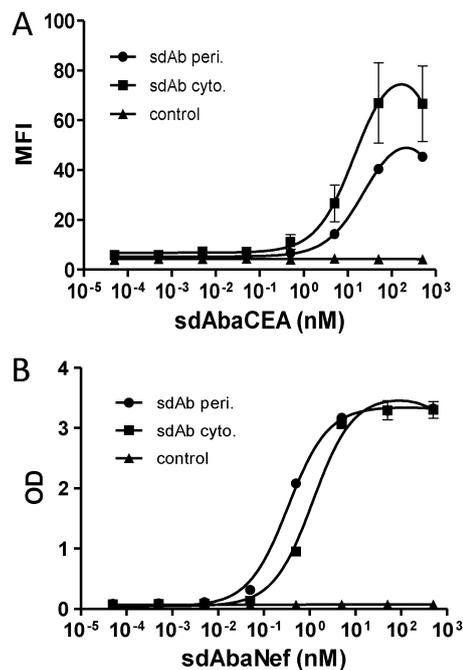


Fig. 1 Functional sdAbs are efficiently produced in the cytoplasm of *E. coli*. (A) MC38-CEA (■, ●) or MC38 (▲) cells were incubated with serial dilutions of anti-CEA sdAb produced in cytoplasm (■) or periplasm (●) of *E. coli*. Captured antibodies were detected by a mouse anti-6his mAb followed by a goat against mouse FITC-conjugated mAb. Cells were analyzed by flow cytometry assay on FACScalibur. (B) Biotinylated Nef antigen (5 nM) coated on streptavidin-plate was incubated with serial dilution of anti-Nef sdAb produced in the cytoplasm (■) or periplasm (●) of *E. coli* or anti-CEA sdAb produced in the cytoplasm of *E. coli* (▲). Captured antibodies were detected by a mouse anti-c-myc mAb followed by a goat anti-mouse HRP-conjugated mAb. Standard deviation represents two experiments performed in triplicates.

apparent affinity of the tagged molecule by avidity effect. As demonstrated by ELISA, (Fig. 2B), mAb 9E10 bound to protein G beads led to a much better sdAb immobilization, leading in turn to a much higher capture efficiency of the model antigen. The sdAb bearing the trimyc tag could be diluted by three orders of magnitude compared to the molecule bearing a single c-myc tag to yield similar signals.

3. Use of crude lysates containing sdAbs

The high efficiencies reached by these immobilization strategies allow the use of very low concentrations of capture sdAbs. We reasoned that the oriented immobilization could be used as a built-in purification procedure, allowing the use of crude bacterial lysates. Indeed, as demonstrated in Fig. 3, as low as 50 nL of a crude lysate containing the *in vivo* biotinylated anti-Nef sdAb yielded the same signal intensity as 1 µg mL⁻¹ of the same purified sdAb on a bead assay, suggesting that a regular microplate sdAb production (30 µL) could be used to generate up to 600 measures.

4. Assay sensitivity

To determine the sensitivity of the trimyc-based assay, beads coupled to 9E10 were incubated with 50 nL of bacterial lysate

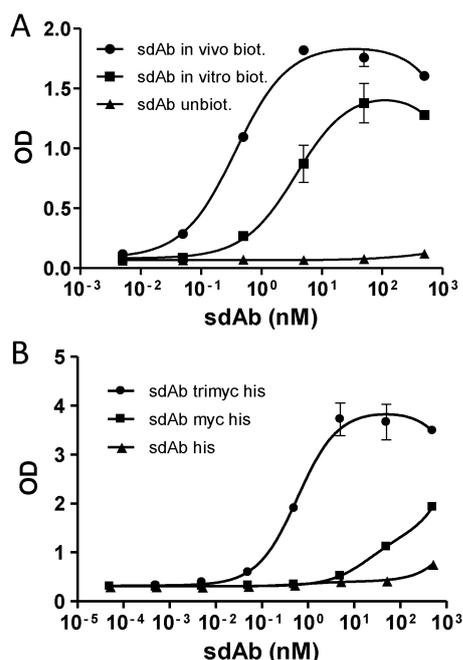


Fig. 2 *In vivo* biotinylation and multi tags strongly improve immobilization of sdAbs. (A) Serial dilutions of pure anti-Nef sdAb biotinylated *in vivo* (●), *in vitro* (■) or unbiotinylated (▲) were coated on a streptavidin plate and incubated with Nef at 5 nM. The captured antigen was detected with a mouse anti-Nef antibody followed by a goat anti-mouse HRP-conjugated mAb. (B) Protein G beads were coated with 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of 9E10 mAb. Serial dilutions of pure sdAbs with three (●), one (■) or no (▲) myc tags were incubated with the bead, followed by biotinylated Nef at 5 nM. The captured antigen was detected with a HRP-conjugated streptavidin. Standard deviation represents two experiments performed in triplicates.

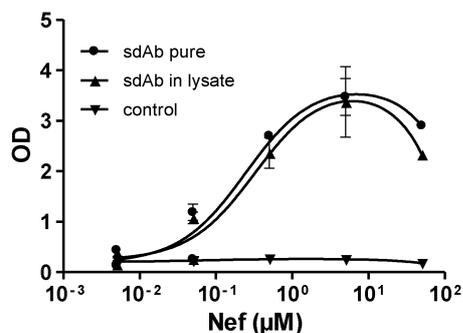


Fig. 3 Bacterial lysates are a good source of capture antibody. Streptavidin beads were coated with sdAb against Nef biotinylated *in vivo* pure (●) ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) or in bacterial lysate (▲) (50 nl/wells) or sdAb against Nef unbiotinylated in bacterial lysate (▼) and incubated with serial dilution of Nef. The captured antigen was detected with a mouse anti-Nef antibody followed by a goat anti-mouse HRP-conjugated mAb. Standard deviation represents two experiments performed in triplicates.

containing the anti-Nef sdAb fused to the c-myc or the trimyc tag. Beads were subsequently incubated with various concentrations of biotinylated Nef.

Bound antigen was detected using streptavidin-HRP. Fig. 4A shows that the trimyc tag yielded much higher signals,

leading to the detection of 0.5 nM of Nef. Similar results were obtained using nitrocellulose arrays. Moreover, 9E10 incubation of slides led to a significant decrease of background noise (Fig. 4B). Interestingly, the single c-myc tag yielded much lower signals. Of note, a direct labeling of Nef with a fluorescent probe (Alexa 488) yielded very poor results in both settings, despite a normal affinity between the Alexa 488-Nef and anti-Nef sdAb (data not shown).

Similar experiments were conducted using the streptavidin/avidin based immobilization strategy and 50 nL of crude bacterial lysate per well. Detection of the bound antigen was performed using three different methods, namely using an anti-Nef mAb followed by a HRP-labeled secondary antibody or an Alexa-labeled secondary antibody, compared to a direct fluorescent labeling of the antigen (Nef-Alexa). As shown in Fig. 4C, the indirect labeling strategies yielded the best results, with a detection limit of 0.5 nM for enzymatic indirect labeling, 5 nM for fluorescent indirect labeling and 50 nM for the fluorescent direct labeling. A detection limit of 0.5 nM was measured on nitrocellulose slides using sandwich fluorescent detection. Streptavidin preincubation of slides further led to a significant decrease of background noise (Fig. 4D).

5. Application to clinically relevant concentration of cancer biomarker

To demonstrate that these strategies can be applied to high-throughput diagnostic approaches, 0.5 μL of crude bacterial lysates containing *in vivo* biotinylated anti-CEA sdAbs were used in a bead based assay to detect soluble CEA in serial dilutions of crude cancer patient sera of known CEA concentration. Detection was performed using an enzymatic sandwich assay. As shown in Fig. 5, soluble CEA could be detected in all CEA-containing sera. The detection limit was established at 10 pM *i.e.* 2 ng mL^{-1} of soluble CEA. This concentration is below the value of circulating CEA in sera of normal donors ($\sim 5 \text{ ng mL}^{-1}$ in undiluted serum) and well below the concentration of cancer patients (178–769 ng mL^{-1}).

Discussion

Most antibody arrays developed to date are low density arrays relying on the use of pure preparation of intact monoclonal antibodies.²⁴ The requisite for high concentrations of pure proteins is hindering the development of high density antibody arrays (in the 200–2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ range). Recombinant antibodies such as scFv fragment offer an interesting alternative since this format is compatible with the generation of scFv libraries and high-throughput selection methods such as phage or ribosome display. Unfortunately, those fragments are constituted by the association of two domains (VH and VL) which decreases their stability. Consequently, very high concentrations of pure fragments (around 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) are often used to build microarrays,^{10,25} which severely complicates the building process of high density antibody arrays.

In this study, we show that highly functional and sensitive arrays could be generated using non-purified affinity tagged single domain antibodies (sdAbs) as probes. These fragments are very easy to produce in *E. coli*, are compatible with cytoplasmic expression and are extremely stable. sdAbs were

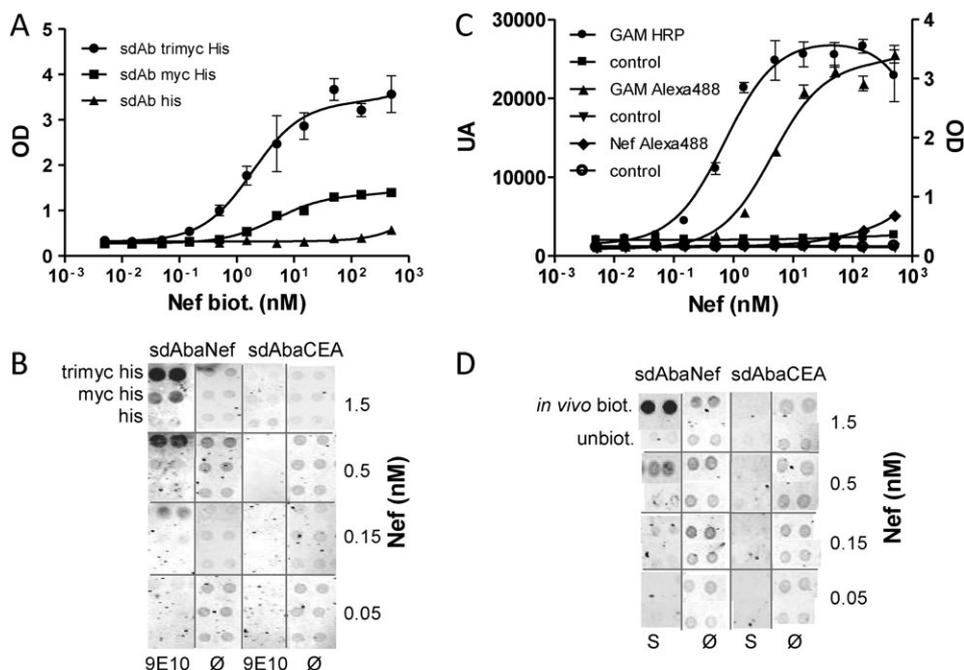


Fig. 4 *In vivo* biotinylated and trimyc-tagged sdAbs in bacterial lysate allow a sensitive antigenic detection on slide or beads. (A) Immobilization of sdAbs using trimyc tag allows the direct use of bacterial lysates. Epoxy beads were coated with 9E10 ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) and incubated with bacterial lysate (50 nl/wells) containing sdAbs with three (●), one (■) or no (▲) c-myc, followed by serial dilutions of biotinylated Nef. The captured antigen was detected with HRP-conjugated streptavidin. (B) Immobilization of sdAbs using trimyc allows direct spotting of bacterial lysate. Nitrocellulose slides were coated with 9E10 (9E10) or PBS (∅). Bacterial lysates containing sdAbs fused to three, one or no c-myc were spotted. Serial dilutions of biotinylated Nef were incubated and the captured antigen was detected with Alexa705-conjugated streptavidin. (C) Streptavidin beads were coated with bacterial lysate (50 nl/wells) containing anti-Nef sdAbs biotinylated *in vivo* (●, ▲, ◆) or not (■, ▼, ○) and incubated with serial dilutions of Nef or Alexa488-conjugated Nef (◆, ○). The captured antigen was detected with a mouse anti-Nef antibody followed by a goat anti-mouse HRP (●, ■) or Alexa488-conjugated mAb (▲, ▼). (D) Nitrocellulose slides were incubated with streptavidin (S) or PBS (∅). Bacterial lysates containing sdAbs biotinylated *in vivo* or unbiotinylated were spotted. Serial dilutions of Nef were incubated and the captured antigen was detected with a mouse anti-Nef antibody followed by a goat anti-mouse Alexa705-conjugated mAb. Standard deviation represents two experiments performed in triplicates.

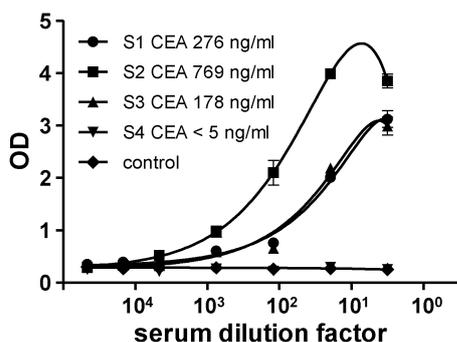


Fig. 5 Immobilization of *in vivo* biotinylated sdAbs allows a sensitive detection of CEA in patient sera using a bead assay. Streptavidin beads were coated with bacterial lysates (0.5 $\mu\text{l/wells}$) containing *in vivo* biotinylated (●, ■, ▼, ▲) or unbiotinylated (◆) anti-CEA sdAbs and incubated with serial dilutions of patient sera (●: S1 CEA 276 ng ml^{-1} , ■: S2 CEA 769 ng ml^{-1} , ▲: S3 CEA 178 ng ml^{-1} , ▼: S4 CEA <5 ng ml^{-1}). The captured antigen was detected with a mouse anti-CEA antibody (35A7) followed by a goat anti-mouse HRP-conjugated mAb. Standard deviation represents two experiments performed in triplicates.

produced in 96 well plate format and successfully coupled, enriched and purified in a one-step procedure directly onto the

support. Indeed, we demonstrate that extremely low amounts, *i.e.* 0.5 to 0.05 μl (probably depending on the sdAb affinity) of crude bacterial lysate produced in three hours is sufficient to perform one assay. Such efficiency was achieved using strong and oriented immobilization on slide arrays or beads, through the use of directed cytoplasmic biotinylation of sdAbs for immobilization on streptavidin coated supports or a tandem repetition of the c-myc tag for immobilization on mAb 9E10-coated support. Oriented immobilization based on being modified with Ni^{2+} -ions¹⁴ or streptavidin^{15,16,26} are examples of surface that have been successfully applied to generate planar protein arrays through specific coupling chemistries. However, to our knowledge, only purified monoclonal antibodies coupled with standard procedures such as carbodiimide and succinimide reactions are currently used for bead arrays.

These two complementary approaches were developed to fulfill two different needs. On the one hand, high sensitivity and specificity are two crucial parameters for diagnostic arrays. In this case, the most efficient approach is the sandwich assay, using a pair of probes to specifically capture and detect the antigen of interest. In this case, non-purified sdAbs can be efficiently immobilized using the biotin/streptavidin setting, to be used as capturing reagent. This method allowed a subnanomolar limit of detection (LOD) of a pure model antigen Nef

using fluorescent and enzymatic detection methods. In a clinical setting, *i.e.* the detection of circulating CEA in sera of cancer patients, a picomolar LOD of CEA in crude serum was obtained with an enzymatic sandwich detection system. In the case of Nef detection, slides or beads as assay support yielded similar results. Of note, direct labeling of the antigen with fluorophore was found to be very inefficient, and chemical sample biotinylation followed by detection with labeled streptavidin led to much higher signals, as already demonstrated by other studies.²⁷ Bead assays are especially suited for sandwich assays and can be directly compared to ELISA methods,²⁸ while requiring much smaller volumes of sample material. Beads can be coded by using various concentrations of fluorescent dye, or by some type of barcoding technology such as size of the bead. Consequently, bead assays can easily be multiplexed. Thus bead arrays are the method of choice for low density antibody arrays for clinical diagnosis.^{29,30} In this work, we show that magnetic beads can efficiently be functionalized using a biotin-based sdAb immobilization. This approach would therefore be the method of choice for the development of cost-efficient sandwich-based antibody bead arrays for diagnostics.

On the other hand, and despite its efficiency, the sandwich assay, requiring a pair of specific probes for each antigen, is not compatible with the generation of high density antibody arrays. These approaches most often necessitate sample labeling (*i.e.* serum or cell lysate), being most efficiently performed using chemical biotinylation and labeled streptavidin.²⁷ For such needs, trimyc-tagged sdAbs were developed to similarly achieve strong and oriented immobilization without involving biotin. Very large sdAb libraries can be built in a one step procedure from immunized llamas without being concerned about the correct combination of VH and VL domains, and rapidly enriched for specific binders by display techniques. Moreover, sdAbs are very efficiently produced in 96 well plates and thus, they represent a rich source of probes to generate high density arrays in a high-throughput fashion. In this work, we demonstrate that high sensitivities in the nanomolar range could be achieved with this setting for our model antigen on beads, but also on planar arrays such as nitrocellulose arrays, clearly more adapted to high density arrays, and demonstrating the feasibility of using crude bacterial lysate to immobilize tagged sdAbs on slide in a high-throughput screening compatible fashion. This approach can further be used for differential screening (*i.e.* using normal *vs.* disease samples) of sdAb libraries enriched on disease material, potentially leading to the discovery of new biomarkers. We are currently applying this approach to isolate breast cancer specific sdAbs from libraries built using animals immunized with breast cancer biopsies.

Abbreviations

mAb	monoclonal antibodies
scFv	single chain Fv fragment
sdAb	single domain antibodies

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, INSERM and by the French National Research Agency (Agence Nationale

de Recherche—ANR) program ‘Nanosciences and Nanotechnologies’ under the grant ANR-07-PNANO-051-01. We would like to thank J. H. Cohen and B. Reveil for the kind gift of patient sera.

References

- 1 R. Ekins, F. Chu and E. Biggart, Multispot, multianalyte, immunoassay, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 1990, **48**, 655–666.
- 2 R. Ekins and F. W. Chu, Microarrays: their origins and applications, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 217–218.
- 3 K. Marcus, C. Joppich, C. May and K. Pfeiffer, *et al.*, High-resolution 2DE, *Methods Mol. Biol.*, 2009, **519**, 221–240.
- 4 T. Joos and J. Bachmann, Protein microarrays: potentials and limitations, *Front. Biosci.*, 2009, **14**, 4376–4385.
- 5 B. Renberg, J. Nordin, A. Merca and M. Uhlen, *et al.*, Affibody molecules in protein capture microarrays: evaluation of multidomain ligands and different detection formats, *J. Proteome Res.*, 2007, **6**, 171–179.
- 6 G. MacBeath and S. L. Schreiber, Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination, *Science*, 2000, **289**, 1760–1763.
- 7 B. B. Haab, M. J. Dunham and P. O. Brown, Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions, *GenomeBiology*, 2001, **2**, RESEARCH0004.
- 8 G. Rousserie, A. Sukhanova, K. Even-Desrumeaux and F. Fleury, *et al.*, Semiconductor quantum dots for multiplexed bio-detection on solid-state microarrays, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2010, **74**, 1–15.
- 9 J. C. Miller, H. Zhou, J. Kwekel and R. Cavallo, *et al.*, Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers, *Proteomics*, 2003, **3**, 56–63.
- 10 A. Carlsson, C. Wingren, J. Ingvarsson and P. Ellmark, *et al.*, Serum proteome profiling of metastatic breast cancer using recombinant antibody microarrays, *Eur. J. Cancer*, 2008, **44**, 472–480.
- 11 J. Ingvarsson, C. Wingren, A. Carlsson and P. Ellmark, *et al.*, Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling, *Proteomics*, 2008, **8**, 2211–2219.
- 12 G. Sauer, N. Schneiderhan-Marra, C. Kazmaier and K. Hutzler, *et al.*, Prediction of nodal involvement in breast cancer based on multiparametric protein analyses from preoperative core needle biopsies of the primary lesion, *Clin. Cancer Res.*, 2008, **14**, 3345–3353.
- 13 D. E. Lyon, N. L. McCain, J. Walter and C. Schubert, Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy., *Nursing Research*, 2008, **57**, 51–58.
- 14 H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham and D. Hall, *et al.*, Global analysis of protein activities using proteome chips, *Science*, 2001, **293**, 2101–2105.
- 15 P. Peluso, D. S. Wilson, D. Do and H. Tran, *et al.*, Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays, *Anal. Biochem.*, 2003, **312**, 113–124.
- 16 P. Pavlickova, A. Knappik, D. Kambhampati, F. Ortigao and H. Hug, Microarray of recombinant antibodies using a streptavidin sensor surface self-assembled onto a gold layer, *Biotechniques*, 2003, **34**, 124–130.
- 17 A. Honegger, Engineering antibodies for stability and efficient folding, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2008, **181**, 47–68.
- 18 C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans and G. Robinson, *et al.*, Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature*, 1993, **363**, 446–448.
- 19 D. Gueorgueva, S. Li, N. Walsh and A. Mukerji, *et al.*, Identification of single-domain, *Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis*, *FASEB J.*, 2006, **20**, 2636–2638.
- 20 S. Muyldermans, Single domain camel antibodies: current status, *J. Biotechnol.*, 2001, **74**, 277–302.
- 21 D. Baty, M. Chartier, P. Chames, S. Benichou, *et al.*, Antibody fragments inhibiting HIV-1 Nef protein, WO/2009/066241, 2009.

-
- 22 G. Behar, P. Chames, I. Teulon and A. Cornillon, *et al.*, Llama single-domain antibodies directed against nonconventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen absent from non-specific cross-reacting antigen, *FEBS J.*, 2009, **276**, 3881–3893.
 - 23 P. Clarke, J. Mann, J. F. Simpson, K. Rickard-Dickson and F. J. Primus, Mice transgenic for human carcinoembryonic antigen as a model for immunotherapy, *Cancer Res.*, 1998, **58**, 1469–1477.
 - 24 V. Knezevic, C. Leethanakul, V. E. Bichsel and J. M. Worth, *et al.*, Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays, *Proteomics*, 2001, **1**, 1271–1278.
 - 25 R. Orzechowski, D. Hamelinck, L. Li and E. Gliwa, *et al.*, Antibody microarray profiling reveals individual and combined serum proteins associated with pancreatic cancer, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 11193–11202.
 - 26 H. Andresen and F. F. Bier, Peptide microarrays for serum antibody diagnostics, *Methods Mol. Biol.*, 2009, **509**, 123–134.
 - 27 A. Zajac, D. Song, W. Qian and T. Zhukov, Protein microarrays and quantum dot probes for early cancer detection, *Colloids Surf., B*, 2007, **58**, 309–314.
 - 28 M. F. Elshal and J. P. McCoy, Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA, *Methods*, 2006, **38**, 317–323.
 - 29 J. M. Schwenk, M. Gry, R. Rimini, M. Uhlen and P. Nilsson, Antibody suspension bead arrays within serum proteomics, *J. Proteome Res.*, 2008, **7**, 3168–3179.
 - 30 R. Rimini, J. M. Schwenk, M. Sundberg and R. Sjoberg, *et al.*, Validation of serum protein profiles by a dual antibody array approach, *J. Proteomics*, 2009, **73**, 252–266.

3. Discussion

Nous avons mis au point deux méthodes efficaces d'immobilisation des sdAbs sur différents types de support. Afin de démontrer l'avantage de ces méthodes, l'immobilisation des sdAbs trimyc ou biotinylés enzymatiquement *in vivo*, a été comparée à celle de sdAbs classiques mono-myc ou biotinylés chimiquement *in vitro*. Nous avons pu observer que les sdAbs trimyc ou biotinylés *in vivo* peuvent être utilisés à des concentrations de 3 à 10 fois inférieures à celles des sdAbs classiques pour un signal identique, ce qui suggère que ce système préserve l'activité de l'anticorps et permet une orientation optimale. La grande efficacité d'immobilisation obtenue grâce à ces stratégies permet l'utilisation d'une concentration très faible de sdAbs pour la capture. Nous avons utilisé l'immobilisation orientée pour réaliser une purification directe des sdAbs sur le support en utilisant un lysat bactérien brut sans étape de purification préalable. Notre système nous permet de purifier, enrichir et immobiliser nos anticorps sur le support en une seule étape à partir de lysats bactériens produits en microplaque en seulement 3 heures. Une production de sdAbs en microplaque (30 μ l) peut être utilisée pour réaliser plus de 600 mesures. Ce système est donc idéal pour la réalisation d'une puce à anticorps à coût réduit.

Pour analyser la sensibilité de nos systèmes et démontrer leur efficacité sur différents types de supports, un antigène modèle Nef (protéine du VIH) a été utilisé. Les essais ont été réalisés sur billes pour la réalisation de puces en phase liquide, et sur lame de nitrocellulose pour la réalisation de puces en phase solide. Nous avons montré que l'approche utilisant des sdAbs biotinylés *in vivo* permet de détecter 500 pM d'antigène sur les deux types de support sans bruit de fond mesurable.

La suite de l'étude a été consacrée à la réalisation de puces en phase liquide. En effet, ce système ressemble énormément aux tests ELISA actuellement utilisés en clinique et pourra donc plus facilement être applicable et accepté pour du diagnostic que des puces en phase solide. Sur ce modèle, le système d'immobilisation des sdAbs sur billes a été testé dans des conditions cette fois ci physiologiques en analysant du sérum de patients pour un antigène bien connu, l'ACE. Un système de détection par sandwich a été utilisé pour ces essais. Une détection de 2 ng/ml d'ACE (10 pM) dans le sérum a été obtenue de façon extrêmement reproductible. Cette limite de détection d'ACE est supérieure au seuil d'ACE considéré comme négatif chez un patient (5 ng/ml), démontrant ainsi la sensibilité et spécificité de ce système d'analyse de sérum.

Ces deux approches d'immobilisations fortes et orientées des sdAbs sont complémentaires. En effet, la première stratégie de biotinylation *in vivo* des sdAbs permet une immobilisation sur un support recouvert de streptavidine et une détection en sandwich par un deuxième anticorps pour une plus grande spécificité et sensibilité. Mais l'utilisation de cette stratégie d'immobilisation prohibe l'utilisation du système biotine-streptavidine pour la détection de l'essai, qui est une méthode efficace couramment utilisée pour des approches à haut débit. A l'inverse, la deuxième approche se base sur l'immobilisation par capture de sdAbs contenant une multi étiquette par des anticorps anti étiquette permettant une détection par marquage direct de l'échantillon, compatible avec les systèmes de marquage biotine, pour une application à plus haut débit.

Partie II :

L'isolement de nouveaux anticorps spécifiques

1. Introduction : Une sélection efficace et spécifique

Le deuxième objectif de ce travail de thèse a été d'isoler des anticorps dirigés contre des cibles spécifiques différentiellement exprimées dans le cancer du sein. En effet, l'isolement d'anticorps à partir d'échantillons biologiques reste un enjeu majeur. Comme nous avons pu le constater au cours de l'introduction, la recherche de nouveaux marqueurs protéiques est principalement réalisée par différentes techniques de spectrométrie de masse. Les limitations de ces approches sont principalement la complexité, la reproductibilité et la présence de protéines majoritaires non spécifiques gênant la détection de nouveaux biomarqueurs potentiels généralement peu abondants. Les anticorps nécessaires au suivi des biomarqueurs d'intérêt sont généralement des anticorps monoclonaux. Mais leur isolement reste difficile et fastidieux, et leur production coûteuse. Des formats recombinants tels que les Fabs ou les scFvs ont été proposés mais leur stabilité n'est pas toujours suffisante. Nous avons donc élaboré une stratégie permettant simultanément la découverte de marqueurs tumoraux spécifiques et l'isolement des anticorps correspondants. Pour cela, nous avons utilisé la technologie du phage display et les anticorps simple domaine de camélidés.

De nombreuses stratégies de sélection par phage display ont été mises au point pour obtenir des anticorps tumeur-spécifiques. Comme nous avons vu au cours de l'introduction, des protocoles divers et variés tels que la déplétion ou l'utilisation de différents phages helpers ont été publiés. Dans notre cas, leur efficacité s'est cependant avérée insuffisante. Nous nous sommes alors tournés vers l'élaboration d'une nouvelle stratégie de sélection plus adéquate.

Après de nombreux essais, une stratégie efficace a pu être mise au point pour isoler une majorité d'anticorps spécifiques : la sélection masquée. Nous avons ensuite montré l'efficacité de notre nouvelle stratégie dans un grand nombre d'applications allant de la sélection d'anticorps dirigés contre une partie précise d'une protéine recombinante à des sélections entièrement effectuées sur cellules transfectées.

L'ensemble des résultats obtenus a permis de réaliser une publication (en cours de soumission) présentée dans la suite de cette partie et un dépôt de demande de brevet a été fait par Inserm Transfert.

2. Article 2

Masked selection: a straightforward and flexible approach for the selection of binders against specific epitopes and differentially expressed proteins by phage display

Masked selection: a straightforward and flexible approach for the selection of binders against specific epitopes and differentially expressed proteins by phage display

Klervi Even-Desrumeaux^{1,2,3,4}, Marie Noelle Lavaut^{1,2,3,4}, Brigitte Kerfelec^{1,2,3,4}, Daniel Baty^{1,2,3,4} and Patrick Chames^{1,2,3,4,*}

¹ *Inserm, U1068, CRCM, Marseille, F-13009, France*

² *Institut Paoli-Calmettes, Marseille, F-13009, France*

³ *Aix-Marseille Univ, Marseille, F-13284, France*

⁴ *CNRS, UMR7258, CRCM, Marseille, F-13009, France*

*Corresponding author: patrick.chames@inserm.fr Phone: +33 4 91828833 Fax +33 4 91826083

Abstract

Phage display is a well-established procedure to isolate binders against a wide variety of antigens that can be performed on purified antigens, but also on intact cells. As selection steps are performed *in vitro*, it is possible to enhance the outcome of the selection by performing some additional steps, such as depletion or competitive elutions. However in practice, the efficiency of these steps is often limited and leads to inconsistent results. We have designed a new selection method named masked selection based on the blockade of unwanted epitopes to favor the targeting of relevant ones. We demonstrate the efficiency and flexibility of this method by selecting single-domain antibodies against a specific portion of a fusion protein, by selecting binders against a member of the 7TM receptor family using intact transfected HEK cells, or by selecting binders against unknown breast cancer markers not expressed on normal samples, as shown by flow cytometry and immunohistochemistry. This new phage display strategy can be applied to any type of antibody fragments and alternative scaffolds and is especially suited for the discovery and identification of cell surface markers.

Keywords

phage display, *in vitro* selection, recombinant antibodies, epitopes, tumor markers

Introduction

Hybridoma¹ and phage-display recombinant antibody systems² are currently the predominant methods for isolating monoclonal Abs. Display of recombinant antibodies (Ab) on the surface of bacteriophage M13 has numerous advantages compared to conventional hybridoma technology. When combined with the use of large non-immune libraries, phage Ab selection represents a rich source of binders that can be isolated in a fraction of the time needed for hybridoma-based approaches. Moreover, this *in vitro* selection methods permits the selection of binders against toxic, non-immunogenic or highly conserved antigens, which is not easily performed using the conventional hybridoma techniques. Importantly, it can be used to isolate

fully human antibody fragments³. Consequently, phage display rapidly became an established procedure for the isolation of binders against a wide variety of antigens.

Phage display-based antibody isolation typically relies on the use of recombinant proteins for several steps, including immunizations (if needed), library enrichment by selection on immobilized antigen, screening, and characterization of antibodies specificity and affinity⁴. This procedure is efficient but depends on the availability of purified recombinant proteins. Unfortunately, some surface molecules, such as G-protein coupled receptors, cannot be easily expressed and purified in a native conformation. Some molecules with large extracellular domains may adopt a specific conformation upon interaction with other cell surface proteins, thereby forming complexes that are cumbersome to produce by recombinant expression. Moreover, many standard screening practices, such as the adsorption of recombinant proteins on plastic, may significantly alter protein conformations⁵. For these reasons, Abs selected on the basis of binding to a recombinant protein may not bind the native conformation of this protein. It is thus of high interest to develop procedures entirely based on the use of intact cells expressing the receptor of choice. However, in this case, an extra step is necessary to enrich for phage-Abs binding to the receptor of interest rather than to other cell surface proteins. Since selection steps are performed *in vitro*, it is possible to influence the outcome of a selection by performing some additional steps such as deletion steps (also named negative selection) prior to positive selections to remove unwanted specificities or cross-reactions⁶, by alternating the source of the antigen⁷, or by using a competitive elution with ligand or an antibody to favor the selection of binders against a precise epitope⁸.

Along this line, it would be of very high interest to establish a procedure able to reliably guide the selection toward an unknown but relevant antigen within a complex mixture, such as a tumor marker overexpressed at the surface of intact cells, or in a cell lysate. Indeed, during the past two decades, there has been a growing interest in approaches aiming at discovering new diagnosis biomarkers and identifying new potential surface markers for targeted therapy. Several studies have described the use of phage display and libraries of recombinant antibodies for the isolation of tumor specific binders⁹⁻¹⁵, leading in some cases to the identification of new tumor markers^{16, 17}. Most of these strategies are based on the use of depletion steps on normal samples followed by a selection step on the tumor sample. Unfortunately, this procedure often leads to inconsistent results and its efficiency can be a limiting factor in complex situation such as the selection of antibodies against unknown overexpressed tumor antigens.

We have designed a new selection method, named masked selection that is relying on the blockade of unwanted epitopes to favor the targeting of relevant ones. We demonstrate the efficiency of this method by selecting binders against a specific portion of a fusion protein, by selecting binders against a member of the seven transmembrane receptor family and a tyrosine kinase receptor using intact transfected HEK cells, or by selecting binders against unknown breast cancer markers not expressed on normal samples, as shown by flow cytometry and immunohistochemistry. The universality and efficiency of this approach should ultimately lead to the rapid selection of specific binders and the development of diagnostic and targeted therapies in various settings.

Results

The principle of masked selection consists in performing two rounds of phage selection on the antigen-negative sample to select binders against immunodominant but non-relevant epitopes (**Fig. S1**). The corresponding non-relevant binders are subsequently produced as a pool of soluble fragments that are added in large excess during a phage display selection performed with the original library on a sample of interest containing the relevant epitope. During this selection, all non-relevant epitopes are thus blocked by the corresponding non-relevant soluble binders (the mask), which greatly favors the selection of binders against the relevant epitopes. This strategy was compared to a mere depletion strategy on four types of samples: recombinant proteins, transfected cell lines, cancer cell lines and cancer biopsies.

1. Selection of phage antibodies against a specific part of recombinant protein HER2-Fc

The proof of principle of this new approach was first established on a simple selection procedure using a purified recombinant protein. A single-domain antibody (sdAb, see ^{18, 19} for review) library was built using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of llamas immunized with various recombinant proteins consisting of fusion between ectodomains of relevant tumor markers and human IgG1 Fc portion, including HER2-Fc. The aim of this first part of the study was to favor the selection of HER2 binders as compared to Fc binders.

A basic strategy (i.e. direct selection of phage antibody produced using helper phage KM13) was compared to conventional depletion strategies on irrelevant Fc bearing molecules prior to positive selection on HER2-Fc fusion. A third approach was developed using hyperphage to produce the phage-antibody particles since it was demonstrated that this helper phage can significantly increase the percentage of phage actually displaying an antibody fragment and the number of antibody fragment displayed per particles (valency). Theoretically, these two factors should increase the efficiency of the depletion strategy. Finally a masked selection strategy was performed using a Human IgG1 Fc fragment protein as non relevant sample.

Fig. 1A shows that the direct selection strategy yielded a majority of Fc binders. The proportion of Fc binders was significantly reduced using a depletion step (with both helper phages). Interestingly, the vast majority of binders obtained by masked selection were HER2 ectodomain binders. DNA sequencing was performed on randomly picked clones to compare the diversity of the different outputs. The direct selection revealed 8 different clones out of 24 binders for the direct selection, 6 different clones for each of the depletion strategy (out of 41 or 37 binders) and 9 different clones out of 69 binders for the masked selection (**Table 1**), suggesting that the masked selection on purified antigen could greatly improve the frequency of relevant binders without markedly impacting the output diversity compared to the depletion strategies.

2. Selection of phage-antibodies against cell surface receptors on transfected cells

Some targets, including for example members of the seven transmembrane receptors, cannot easily be recombinantly produced as soluble protein with a native conformation. In such cases, phage display can be used to select relevant binders by using a positive selection on

transfected cells following a depletion step on the corresponding untransfected cell line. We decided to compare the efficiency of depletion vs. masked selection for the selection of binders against the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) and metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4), a member of the metabotropic G-protein-coupled glutamate receptor family. For these experiments, we used a sdAb library that had been generated after immunization with HER2- or mGluR4- transfected HEK293T (HEK) cells. As shown in **Fig. S2**, the surface expression level of these two receptors was different, mGluR4 being better expressed than HER2. Untransfected HEK293T cells were used for depletion steps and for the selection of masking sdAbs. The outputs of both strategies were analyzed by phage ELISA on transfected and untransfected cells (**Fig.1B**). In the case of HER2 receptor, the output of the depletion/selection strategy was mainly constituted of unspecific HEK binders, yielding only 7 % of HER2 binders. The use of Hyperphage as helper phage for high display conditions did not improve (8%) this yield. However, the masked selection approach improved more than 3 times the output with 26% of HER2 binders.

DNA sequencing of a subset of the positive clones revealed 2 different clones out of 6 HER2 binders obtained by each of the two depletion strategies and 5 different clones out of 24 HER2 binders selected by masked selections (**Table 1**). The dominant clone A.B5 was found in all different strategies. Several clones that had been isolated on purified antigens were not retrieved by any of the cell selections. Conversely, clone H.H8 was only retrieved by masked selection on cells.

All the 15 anti-HER2 binders obtained so far using recombinant antigen or transfected cells were produced as soluble fragments to be further characterized in terms of specificity and affinity. Their specificity was first confirmed by ELISA. **Fig. S3** shows that all clones (including sdAb H.H8) yielded a high signal on HER2-Fc and were negative against Fc. Next, flow cytometry on HER2 positive cells was used to demonstrate the ability of these anti-HER2 sdAbs to bind their antigen in a native context. All clones were found positive (**Fig. S4A**), including the 7 clones that were selected on recombinant antigen but not through cell selections. A competition assay was then performed to analyze the ability of each sdAb to compete with the others. The binding of phage-sdAbs on HER2 positive cells was investigated by flow cytometry in the presence of a large excess of each purified soluble sdAb (**Fig.4SB**). At least three groups of sdAbs binding to three independent HER2 epitopes could be established (**Fig. S4C**), and at least one member of these three groups had been isolated using masked selection.

A third independent approach based on Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF, ²⁰) was finally used to clearly establish the specificity and determine the affinity of anti-HER2 sdAbs. HEK cells were transfected with HER2 fused to the SNAP tag allowing a site-directed labeling of the receptor at the cell surface with a donor fluorophore. Bound sdAbs were detected using an anti-His tag monoclonal antibody labeled with an acceptor fluorophore. In this setting, the excitation of the donor fluorophore leads to a fluorescence emission of the acceptor fluorophore (FRET effect) if these two molecules are in close proximity, i.e. if the sdAb is bound to HER2. As shown in **Fig. 2A**, all anti-HER2 sdAbs were found positive in this assay whereas an irrelevant (anti-Fc) sdAb did not yield any signal. SdAb H.F6 yielded a lower signal, in agreement with flow cytometry results.

Interestingly, three clones (A.E6, A.E4 and C.E10), shown to bind the same or overlapping epitopes yielded significantly lower FRET signals, suggesting that these epitopes are more distant to the SNAP tag than the other epitopes.

Dose response curves of the 12 best binders were used to determine the sdAb dissociation constants (**Fig. S5A**). The calculated K_D values using a non-linear curve fitting program ranged between 0.5 and 7.3 nM (**Fig. S5B**).

To see if similar results could be obtained on a different type of receptors, depletion and masked strategies were applied to the selection of sdAbs against the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). This receptor belongs to the seven-transmembrane G protein-coupled receptor family and is a good example of target antigen which is difficult to produce recombinantly. In this case, all steps, i.e. immunization, selection and screening, were performed using mGluR4 transfected HEK cells.

A conventional depletion step on non transfected HEK cells followed by a selection on mGluR4-transfected cells yielded a vast majority of HEK binders and less than 13% of mGluR4 binders (**Fig. 1B**), despite the high cell surface expression level of the transfected receptor (**Fig. S2**). In sharp contrast, the masked selection strategy was highly successful since 90% of the output was specific for the relevant receptors and only 4% of the outputs were HEK binders (**Fig. 1B**).

The sequencing of 47 mGluR4 binders obtained by masked selection revealed 19 different clones, suggesting again this approach can lead to a good diversity of binders.

Soluble sdAbs corresponding to these 19 clones were produced, purified and characterized by HTRF experiments on mGluR4 transfected cells. As shown in **Fig. 2B**, all clones yielded high HTRF signals demonstrating their specificity for mGluR4, in contrast to an irrelevant anti-Fc sdAb that was found negative. Dose response curves and non-linear curve fitting analysis of five best binders (**Fig. S5C**) were used to determine their dissociation constants. K_D values of these monovalent single domain antibodies ranged from 3.9 to 30 nM (**Fig. S5D**).

3. Selection of phage antibodies with breast cancer specificity

The efficiency of masked selection being established on transfected HEK cells, we applied this approach to the selection of binders against unknown antigens overexpressed in cancer samples. Llamas were immunized with breast cancer biopsies and the resulting sdAb libraries were selected against either breast cancer cell lines or breast cancer biopsies, using human peripheral blood mononuclear cells and the human mammary epithelium cell line HME1 (immortalized by hTERT expression) as normal sample.

3.1 Selection on breast cancer biopsy lysates

Selections were performed on a mixture of 11 breast cancer biopsy lysates (see Materials and Methods). A lysate of human peripheral blood mononuclear cells mixed to a lysate of human mammary epithelium cell line HME1 (immortalized by hTERT expression) was used as normal sample. A classical approach using depletion was compared to an approach using

depletion plus masked selection (using sdAbs selected from the same library by panning on the normal sample), and the use of KM13 or hyperphage was compared in both case.

Ninety six clones were randomly picked after two rounds of selection for each approach. A phage ELISA screening procedure using plastic-adsorbed biopsy or normal sample lysates was performed to evaluate the specificity of the selected binders. The depletion strategy yielded a majority of clones binding to all lysates, and only 13% (KM13) and 9% (hyperphage) of clones showing specificity for the biopsy lysates (**Fig. 3A**). Addition of masking sdAbs during the selection step drastically decreased the number of non-cancer specific clones down to 2-3%, and increased the proportion of cancer-specific clones to 40% (KM13) and 30% (hyperphage) (**Fig. 3A**). DNA sequencing of 53 biopsy lysate binders revealed 9 different sequences (**Fig. S6A**). Competition experiments performed by phage ELISA in the presence of an excess of each purified sdAb indicated that 4 of these clones were sharing a common epitope (**Fig. S6B**). A representative clone of this family and the 5 other sdAbs targeting independent epitopes were further characterized.

To confirm the specificity of these sdAbs for breast cancer, phage ELISA was performed on a panel of immobilized lysates from 11 different breast cancer biopsies, and on a mixture of breast cancer cell line lysates (see material and methods). As expected, lysates of PBMCs and HME1 cell yielded no signal. Interestingly, various binding profiles were generated against the 11 breast cancer biopsy lysates (**Fig 4A**). To further investigate the cancer specificity of these antibody fragments, they were produced and purified as soluble fragments and tested by immunohistochemistry. Out of 6 tested sdAbs, only sdAb J.H6 yielded a strong signal on paraffin embedded tissue. This sdAb was thus further characterized on larger scale using breast cancer tissue microarray including 80 breast cancer samples (lobular and ductal breast cancer biopsies) and 14 healthy breast samples. None of the normal samples were stained by this sdAb while 75% of breast cancer biopsies were positive (**Fig. 4C**). **Fig. 4B** shows immunohistochemistry results on representative samples (cancer biopsies and normal samples).

3.2 Selection for cell surface binders on breast cancer cell lines

While intracellular cancer specific antigens can be useful as biomarkers for diagnosis purposes, they are not compatible with some therapeutic approaches such as therapeutic antibodies. For these approaches, the identification of cancer-specific membrane antigens is required. To evaluate the potential of masked selection in this case, and using the same sdAb library, we compared the output of two rounds of selection performed on a mixture of 4 different breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF7, SKBr3, HCC1954) using a simple depletion step on a mixture of intact human PBMCs and normal breast epithelial cell line HME1 (PBMC + HME1), or a combination of depletion and masked selection using sdAbs from the same library selected on PBMC + HME1. Ninety six clones from each selection strategy were screened as phage-sdAb by flow cytometry on the mixture of breast cancer cell lines, and PBMC+HME1.

As shown in **Fig. 3B**, a standard depletion strategy did not succeed in isolating any cancer specific clones whatever the helper phage used whereas 60% and 35% of the 96 tested clones were positive on PBMC + HME1 for KM13 and hyperphage respectively. The addition of the

masking sdAbs during the selection step not only blocked very efficiently the selection of unwanted PBMC+HME1 binders, but allowed the selection of 6 to 12 clones that specifically bound to the mixture of breast cancer cell lines, depending on the helper phage. DNA sequencing of these 18 binders revealed 11 different sequences (**Fig. S6C**). Flow cytometry competition experiments performed using purified sdAbs indicated that 6 different epitopes were targeted by these 11 different sdAbs (**Fig. S6D**). A representative binder of each epitope was chosen for further studies. These 6 purified sdAbs were tested by flow cytometry against 6 different breast cancer cell lines including the 4 used for selection, 7 other cancer cell lines of various origins, against normal breast epithelial cell line HME1 and against human PBMCs. As shown in **Fig. 5A**, none of the sdAbs were positive on normal cells. Four sdAbs (M.C9, M.B9, M.H3, M.H12) were strongly positive against most of the tested cancer cell lines. sdAbs M.D5 specifically recognized 2 of the 4 breast cancer cell lines used for selection whereas sdAb M.A4 was positive on only one breast cancer cell line (MDA-MB-231) but recognized two other types of cancer cell lines such as well as PC3 (prostate cancer) and HeLa (cervical cancer).

Immunohistochemistry characterization demonstrated that two of these sdAbs (M.H3, M.H12) were functional on paraffin embedded tissues. These sdAbs were thus assayed on breast cancer tissue micro array. **Fig. 5B** displays representative results obtained with these two sdAbs. None of the 14 healthy samples were stained by these two sdAbs. In sharp contrast, 98% or 79% of breast cancer biopsies were strongly stained by sdAb M.H3 and M.H12, respectively (**Fig. 5C**).

Discussion

Beside depletion (negative selection), several techniques have been proposed to focus a phage selection on a particular antigen or epitope, including guided selection^{21, 22}, competitive elutions⁸, or alternating of the source of antigen⁷. These techniques have been successfully used in several studies but they are limited in several aspects. Guided selection depends on the availability of a cloned antibody and is labor-intensive. Competitive elution uses a known ligand or monoclonal antibody to specifically elute phage-antibodies binding to the same epitope. Unfortunately this strategy has a tendency to favor the selection of low affinity binders. The availability of various sources of an antigen of interest (expressed on cell and as purified protein, for example) can be a limiting factor. But most importantly, none of these approaches can be used for target discovery.

We have designed a new procedure to restrict the output of phage display selections toward specific epitopes of a chimeric protein, toward transfected membrane receptors and toward specific or overexpressed cancer markers using crude lysates, or intact cells when surface markers are preferred. The masked selection is based on a competition between masking antibody fragments and phage particles. The general concept underlying this approach is merely to block unwanted epitopes using the addition of an excess of binders previously selected from the very same library by panning against the non relevant sample. This procedure can be very efficient since the input of a selection procedure usually contains 10^{12} phage particle in 1 mL, leading to a phage concentration of around 2 nM. Single domain antibodies used in this study are easily produced in *E. coli* and we routinely use 10 μ M of

polyclonal sdAbs for the masking procedures, ensuring a huge excess of sdAbs over phage-sdAbs to guarantee an efficient blockade of non relevant epitopes.

In all cases, from a very simple selection on purified antigen, to the selection on binders against overexpressed tumor markers, the principle of masking non-relevant epitopes was shown to be more efficient than conventional depletion. This advantage was most obvious when using highly complex sources of antigens such as intact tumor cells. This simple procedure is very powerful because it takes advantage of the potential biases of a library. Indeed, libraries often contain a large number of binders directed against non-relevant but highly abundant or very immunoreactive epitopes. These binders often out-compete binders against scarce but potentially relevant epitopes when selections are performed on complex samples. Masked selection should be very efficient in this case because these dominant binders targeting abundant proteins would be very efficiently selected. By this process, the polyclonal population of soluble binders selected on the non-relevant sample (the mask) will be enriched for binders that have to block the most problematic (abundant and/or immunoreactive) epitopes.

In this study, masked selection was compared to a depletion strategy. Our results demonstrate some efficiency of depletion but also highlight its shortcomings in difficult selections on complex samples. The principle of depletion relies on the capture of non relevant binders from the phage population before positive selection. This approach can improve the specificity of an output but cannot be totally efficient since, as for any non covalent interaction, a fraction of the total phage-antibody to be depleted will stay in solution at a ratio dependent on the affinity of the antibody. Increasing the number of pIII fused to an antibody fragment using for example hyperphage as helper phage should increase the apparent affinity of binders and thus increase the proportion of bound phage during the depletion step. Such an effect could be seen in this study on depletion performed on Fc portion but was not visible on selections performed on complex samples.

This work demonstrates that masked selection can greatly increase the number of target-specific binders, without significantly impacting on the diversity of selected clones, or on their affinity, since several binders of nanomolar range affinities were selected against several epitopes of the various antigens targeted in this study. But most importantly it can efficiently leads to the selection of binders against unknown but differentially expressed targets, which can be exploited in a wide variety of studies. The relevant target can be subsequently identified by immunoprecipitation and mass spectrometry analysis ⁷, which has a great potential for many fields, including cancer therapy. It should also be of high interest for many other purposes, such as the identification of specific cell surface receptors of some cell types, such as normal and cancer stem cells or regulatory T cells, for example. In principle, this technique is very flexible and can be used with any kind of antibody fragments (scFv, Fab fragments), alternative scaffolds (darpins, monobodies, affibodies, anticalins...) ^{23, 24}, or even other type of display such as ribosome display ²⁵

Materials and methods

Cells lines, biopsies

MCF7, SK-BR-3 and T47D are a kind gift of Daniel Olive (CRCM, Marseille, France). MDA-MB-231 and HCC1937 are a kind gift of Marie Alix Poul (IRCM, Montpellier). BrCa-Mz-01, HCC1806, HCC1954 and BT474 are a kind gift of Jean Imbert (INSERM, U928, TAGC, Marseille, France). C4.3 is a kind gift of Ralph Willemsen (Erasmus MC, Rotterdam). Jurkat, HEK293T, HeLa, HT29, PC3 and BxPc3 cells were obtained from ATCC. Cells lines MDA-MB-231, MCF7, T47D, HCC1937, HEK293T, HeLa, HT29, PC3 were cultured in DMEM complemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Cells lines SK-BR-3, HCC1954, BrCaMz01, BT474, BxPc3, C4.3, Jurkat and HCC1806 were cultured in RPMI complemented with 10% (v/v) fetal calf serum. HME1 cell line was purchased from ATCC and grown as recommended by the manufacturer. All cell lines were grown at 37°C in a humidified atmosphere and with 5% CO₂. PBMC were isolated from the blood of healthy donors by ficoll gradient centrifugation method. For transfection assay, HEK/293T were transfected with Lipofectamine (Invitrogen), following the recommendation of the manufacturer.

Breast cancer biopsies (5801, 5772e, 5766, 5586, 5572i, 5592, 5011, 5712, 5713, 5033, 5627 kind gift of S. Garcia, CRCM, Marseille) or cells were lysed with a potter in lysis buffer : 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH8 with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche). The lysate was centrifuged for 10 min at 13000 g at 4°C. Supernatant was the final cell lysate. Total protein concentration (average between 2-5 mg/ml) was determined spectrophotometrically using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Production and purification of sdAbs

For polyclonal production of soluble sdAbs, 10 µl of output from selection round 1 and 2 were used to inoculate 200 ml of 2YT / ampicillin (100 µg/mL). Cells were grown at 37 °C (250 rpm) until the OD₆₀₀ reached 0.5. sdAb expression was induced by the addition of 0.1 mM IPTG (isopropyl-h-D-thiogalactopyranoside) at 30°C (250 rpm) for 20 h. sdAbs were purified by metal affinity chromatography as described²⁶.

In vitro Biotinylation

The in vitro biotinylation of protein was performed using Ez-link micro NMHS-PEO4-biotinylation kit (Perbio science) following the recommendation of the manufacturer.

Llama immunization and library construction

Three young adult llama (Lama glama) were immunized subcutaneously at days 1, 30, 60, 90 and 120 with breast cancer biopsy lysate (two llamas) or with healthy breast biopsy (one llama). One llama was immunized with HER2-Fc protein and HEK-mGluR4 cells. VHH library constructions were performed as described^{14, 27}

Selection of phage-sdAbs

To produce phage-sdAbs, 10 μ L of the library was grown in 50 mL of 2YT / ampicillin (100 μ g/mL) / glucose (2%) at 37 °C to an OD₆₀₀ of 0.5. Then, the culture was infected with KM13 or hyperphage (Progen biotechnik) helper phage with a ratio of 20 phage/cell for 30 min at 37 °C without shaking. The culture was centrifuged for 10 min at 3000 g. The bacterial pellet was resuspended in 250 mL of 2YT / ampicillin (100 μ g/mL) / kanamycine (25 μ g/mL), and incubated overnight at 30 °C with shaking (250 rpm). Twenty five mL were then centrifuged for 20 min at 3000 g. Five mL of 20% PEG 6000, 2.5 M NaCl were added to the supernatant and incubated for 1 h on ice to precipitate phage particles. The solution was centrifuged for 15 min at 3000 g at 4°C and the phage-containing pellet was re-suspended with 1 mL of PBS.

Different strategies of panning were performed. Some phages were selected using magnetic epoxy beads (Dynabeads, invitrogen) coated with antigen or lysates immobilized on epoxy beads during 48 h at 4°C following recommendations of the manufacturer. Other phages were selected directly on cells (30x10⁶ cells). Beads or cells were washed three times in PBS (using a magnetic particle concentrator for magnetic beads and centrifugation step for cells) and phage-sdAb library (1 ml) and beads or cells were saturated in 2% milk PBS. For selection including a depletion step, phage-sdAb library were incubated with the irrelevant immobilized antigen at room temperature or with 80x10⁶ irrelevant cells at 4°C during 2 h, with rotation. Phage-sdAb libraries (depleted or not) were recovered and incubated with beads with rotation during 2 h at room temperature or at 4°C for cells. For masked selection in the presence of soluble sdAbs, 10 μ M of purified sdAbs were added during this step. Beads, cells or plate were washed 10 times with 1 ml 0,1% Tween PBS (without Tween for cells) and two times with PBS. Bound phage were eluted with trypsin solution (Sigma) at 1 mg/ml during 30 min at room temperature with rotation. Eluted phage were incubated without shaking with log-phase TG1 cells and plated on 2YT / ampicillin (100 μ g/mL) / glucose (2%) in 15 cm Petri dishes. Some isolated colonies were grown overnight in microtiter plate containing 200 μ L 2YT / ampicillin (100 μ g/mL) / glucose (2%) and stored at -80 °C after the addition of 15% glycerol (masterplates). The remaining colonies were harvested from the plates, suspended in 2 mL 2YT/ ampicillin (100 μ g/mL) / glucose (2%) and used for phage production for the next round of selection. Two rounds of selection were systematically performed.

Monoclonal phage-sdAb production in microtiter plate

A 96-well plate replicator was used to replicate the masterplates in 150 μ L of 2YT/ ampicillin (100 μ g/mL) / glucose (2%). Colonies were grown for 2 h at 37 °C under shaking (400 rpm) and 50 μ L 2YT/ ampicillin (100 μ g/mL) / glucose (2%) containing 2x10⁹ M13KO7 helper phage were added to each well and incubated for 30 min at 37 °C without shaking. The plate was centrifuged for 10 min at 1200 g and bacterial pellets were suspended in 150 μ L 2YT / ampicillin (100 μ g/mL) / kanamycine (25 μ g/mL) and grown for 16 h at 30 °C under shaking (400 rpm). Phage-containing supernatants were tested for binding by ELISA or flow cytometry.

Phage-sdAb ELISA on epoxy beads

Antigens HER2-Fc (R & D systems) or Fc were immobilized on magnetic epoxy beads (Dynabeads, invitrogen) during 48 h at 4°C following recommendation of the manufacturer. For ELISA, 2 µl of beads/well was used. After three washes, beads were blocked with 5% milk-PBS (MPBS) for two hours at RT. Plates were incubated for 1 h at RT with 50 µl/well of phage-containing supernatants diluted at ½ in 4% MPBS. After three washes with 0.1% Tween PBS and three washes in PBS, plates were incubated with HRP-conjugated anti-M13 mAb (Pharmacia) diluted 1/5000 during 1 h at RT. After three washes with 0.1% Tween PBS and three washes in PBS, bound secondary antibodies were detected using ABTS. Coloration was followed at 405 nm.

Phage-sdAb ELISA with lysate coated on plate

Fifty µl/well of biopsy mixture, or breast cancer cell lines (BT474, SK-BR-3, HCC1954, MCF7, MDA-MB-231, T47D, HCC1806, BRCA-Mz-01, HCC1937) or control cells HME1 and human PBMC lysates (200 µg/ml of total proteins) were coated overnight at 4°C on maxisorp 96-well plate (Nunc). After three washes with PBS, plates were blocked with 5% MPBS for two hours at RT. For competitive assay, plates were incubated with 50 µl/well of sdAbs at 10 µg/ml during 1 h at RT. Plates were incubated for 1 h at RT with 50 µl/well of phage-containing supernatants diluted at ½ in 4% MPBS. After three washes with 0.1% Tween PBS and three washes in PBS, plates were incubated with HRP-conjugated anti-M13 mAb (Pharmacia) at 1/5000 during 1 h at RT. After three washes with 0.1% Tween PBS and three washes in PBS, bound secondary antibodies were detected using ABTS. Coloration was followed at 405 nm.

Flow cytometry assay

Experiments were performed on ice with rocking in 1% BSA PBS. Typically, 2×10^5 cells resuspended in 50 µl were distributed in 96-well microtiter plates. For competitive assay, plates were incubated with 50 µl/well of sdAbs at 10 µg/ml during 1 h at 4°C. Fifty µl of phage-containing supernatants diluted at ½ in 2% BSA PBS (for phage-sdAbs assay) or 50 µl of in vitro biotinylated purified sdAbs at 10 µg/ml (for soluble sdAbs assay) were added to each well. Plates were incubated for 1 h at 4°C. After three washes in PBS, plates were incubated with PE-conjugated anti-M13 mAb at 1/200 (Santa Cruz) for phage-sdab detection or with PE-conjugated streptavidine at 1/10 (Beckman Coulter) for biotinylated sdAb detection, during 1 h at 4°C. After three washes in PBS, fluorescence was measured using a MACSQuant (Miltenyi) and results were analyzed with the MACSQuant software. Negative (secondary antibody only) controls were carried out.

HTRF assay

A 96-well plate replicator was used to replicate the masterplates in 150 µL of fresh broth. Colonies were grown for 2 h at 37 °C under shaking (900 rpm) and 15 µL 2YT/ ampicillin (100 µg/mL)/containing 0.1 mM IPTG were added to each well. The plate was incubated for 16 h at 30°C with shaking (400 rpm). sdAb-containing supernatants were tested for binding

by HTRF. To measure HTR-FRET signals, HEK cells were transfected plasmids coding for SNAP-tagged HER2 or mGluR4 receptors N-terminally fused to a SNAP tag 24 h prior to the assay (plasmids were a kind gift of Gérard Matthis and Jean-Philippe Pin, CisBio Bioassays, Marcoule, France and IGF, Montpellier, France, respectively). Cells were labeled with Tag-lite Snap-Lumi4-Tb, according to the manufacturer's kit protocol (Cisbio Bioassays). sdAb and D2 labeled anti-6his mAb (Cisbio Bioassays) were added simultaneously. After incubation for 1 hour at RT, HTR-FRET signal (665 nm) and Lumi4-Tb donor signal (620 nm) were measured using a Tecan infinite M1000. HTRF ratio ($665 \text{ nm}/620 \text{ nm} \times 10^4$) was calculated to eliminate quenching and dispensing errors.

Immunohistochemistry assay

In vitro biotinylated sdAbs were assayed in immunohistochemistry on $5 \mu\text{m}$ sections of paraffin-embedded cancer tissue. In addition, adjacent normal breast epithelium served as specificity control. A breast cancer tissue micro array containing 80 samples in duplicate (containing lobular and ductal breast cancer biopsies from grade I to III tumors with local lymph node invasion or not) and 14 samples healthy breast tissues in duplicate was also used. After deparaffinization of paraffin-embedded tissues, antigen retrieval of paraffin-embedded tissues was performed in 95°C pre-warmed citrate buffer during 20 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with 3% H_2O_2 . Slides were incubated for 1h with in vitro biotinylated sdAbs at $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ at room temperature and washed. Detection was performed by incubations at room temperature 30 min streptavidin peroxidase. Finally, visualization was performed by a DAB revelation (Dako) peroxidase reaction with haematoxylin as counterstain.

Acknowledgements

This work was supported by the ANR (Agence Nationale de Recherche) program 'Nanosciences and Nanotechnologies' under the grant ANR-07-PNANO-051-01 and by the ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer). We would like to thank Stéphane Garcia for biopsies and TMA, Gérard Matthis and Jean-Philippe Pin for the kind gift of SNAP tag vectors and Daniel Olive, Marie Alix Pool, Ralph Willemsen and Jean Imbert for the gift of cell lines.

Competing interests

The author(s) declare no competing interests.

Authors' contributions

KE-D performed most experiments, DB, KE-D and PC designed the experiments, KE-D, BK and PC wrote the manuscript.

References

1. Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
2. McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554 (1990).
3. Weiner, L.M. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother* **29**, 1-9 (2006).
4. Hoogenboom, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **23**, 1105-1116 (2005).
5. Ngai, P.K., Ackermann, F., Wendt, H., Savoca, R. & Bosshard, H.R. Protein A antibody-capture ELISA (PACE): an ELISA format to avoid denaturation of surface-adsorbed antigens. *J Immunol Methods* **158**, 267-276 (1993).
6. Siva, A.C. et al. Selection of anti-cancer antibodies from combinatorial libraries by whole-cell panning and stringent subtraction with human blood cells. *J Immunol Methods* **330**, 109-119 (2008).
7. Even-Desrumeaux, K., Fourquet, P., Secq, V., Baty, D. & Chames, P. Single-domain antibodies: a versatile and rich source of binders for breast cancer diagnostic approaches. *Mol Biosyst* (2012).
8. Veggiani, G., Ossolengo, G., Aliprandi, M., Cavallaro, U. & de Marco, A. Single-domain antibodies that compete with the natural ligand fibroblast growth factor block the internalization of the fibroblast growth factor receptor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **408**, 692-696 (2011).
9. Stefan, N. et al. DARPins recognizing the tumor-associated antigen EpCAM selected by phage and ribosome display and engineered for multivalency. *J Mol Biol* **413**, 826-843 (2011).
10. Liew, P.X., Ge, F., Gullo, C., Teoh, G.K. & Hwang, W.Y. Use of phage display to isolate specific human monoclonal antibody fragments against a potential target for multiple myeloma. *Ann Acad Med Singapore* **38**, 621-629 (2009).
11. Omidfar, K. et al. Production of a novel camel single-domain antibody specific for the type III mutant EGFR. *Tumour Biol* **25**, 296-305 (2004).
12. Mazuet, C., Lerouge, D., Poul, M.A. & Blin, N. Breast carcinoma specific antibody selection combining phage display and immunomagnetic cell sorting. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 550-559 (2006).
13. Nielsen, U.B. & Marks, J.D. Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: direct selection from phage display libraries. *Pharm Sci Technolo Today* **3**, 282-291 (2000).
14. Behar, G. et al. Llama single-domain antibodies directed against nonconventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen absent from nonspecific cross-reacting antigen. *FEBS J* **276**, 3881-3893 (2009).
15. Roovers, R.C., van der Linden, E., de Bruine, A.P., Arends, J.W. & Hoogenboom, H.R. Identification of colon tumour-associated antigens by phage antibody selections on primary colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* **37**, 542-549 (2001).
16. Jensen, K.B., Jensen, O.N., Ravn, P., Clark, B.F. & Kristensen, P. Identification of keratinocyte-specific markers using phage display and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **2**, 61-69 (2003).
17. Geuijen, C.A. et al. A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. *Eur J Cancer* **41**, 178-187 (2005).
18. Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* **74**, 277-302 (2001).
19. Harmsen, M.M. & De Haard, H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 13-22 (2007).
20. Degorce, F. et al. HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr Chem Genomics* **3**, 22-32 (2009).
21. Beiboer, S.H. et al. Guided selection of a pan carcinoma specific antibody reveals similar binding characteristics yet structural divergence between the original murine antibody and its human equivalent. *J Mol Biol* **296**, 833-849 (2000).
22. Figini, M. et al. Panning phage antibody libraries on cells: isolation of human Fab fragments against ovarian carcinoma using guided selection. *Cancer Res* **58**, 991-996 (1998).
23. Stumpp, M.T. & Amstutz, P. DARPins: a true alternative to antibodies. *Curr Opin Drug Discov Devel* **10**, 153-159 (2007).
24. Gebauer, M. & Skerra, A. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* **13**, 245-255 (2009).
25. Zahnd, C., Amstutz, P. & Pluckthun, A. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat Methods* **4**, 269-279 (2007).
26. Even-Desrumeaux, K., Baty, D. & Chames, P. Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation. *Mol Biosyst* **6**, 2241-2248 (2010).
27. Alvarez-Rueda, N. et al. Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical hapten. *Mol Immunol* **44**, 1680-1690 (2007).

Tables

Table 1. Frequency of anti-HER2 clones isolated by various strategies

	clones	C.A	C.G	A.A	A.F	A.B	B.F	A.E	A.E	C.E	A.D	C.E	A.H	C.D	H.F	H.H
		5	5	10	1	5	11	6	4	4	6	10	10	4	6	8
HER2-Fc	Direct	1		1	7	11		1	1		1		1			
	Dep. K				2	29	7			1	1				1	
	Dep. H	1			3	24	7			1	1					
	Mask	8	1		19	30	7		1	1		1		1		
HEK-HER2	Dep. K				1	5										
	Dep. H	1				5										
	Mask	1			9	12								1	1	

Dep. K: Depletion step, and use of helper phage KM13; Dep. H: Depletion step, and use of helper phage Hyperphage; Mask: Masked selection.

Figure

Figure 1

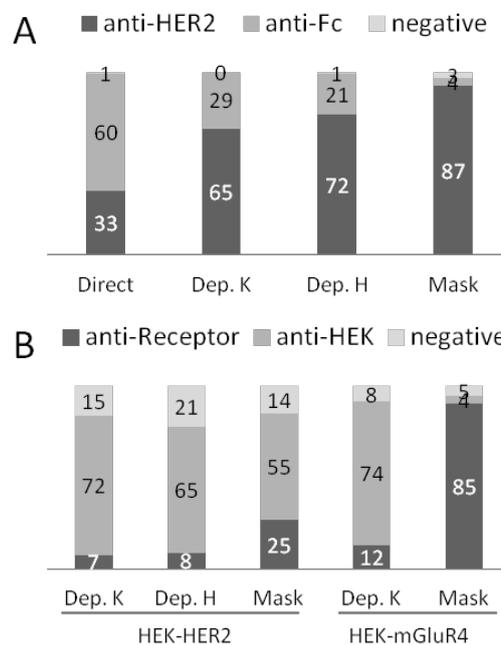


Figure 1: Phage ELISA analysis of clone selected on known antigens A) Screening of clones selected on recombinant HER2-Fc. 94 clones randomly picked from each type of selection were assayed by monoclonal phage ELISA for binding to HER2-Fc, or Fc. Clones yielding a positive signal on HER2-Fc but not on Fc were considered anti-HER2. Those positive on HER2-Fc and Fc were considered anti-Fc and those negative on both were

considered non binders (negative). Direct: simple selection. Dep. K: Depletion step, KM13 helperphage. Dep. H: Depletion step, hyperphage helperphage. Mask: Masked selection. **B**) Phage ELISA analysis of clones selected on transfected cells. 94 clones randomly picked from each type of selection were assayed by monoclonal phage ELISA for binding to HEK cells, HEK cells transfected with HER2 (HEK-HER2) or cells transfected with mGluR4 (HEK-mGluR4). Binders yielding signals on transfected cells but not on HEK cells were considered receptor-specific (anti-Receptor), those yielding signal on all type of HEK cells were considered HEK-specific (anti-HEK) and those negative on all cells were considered negative.

Figure 2

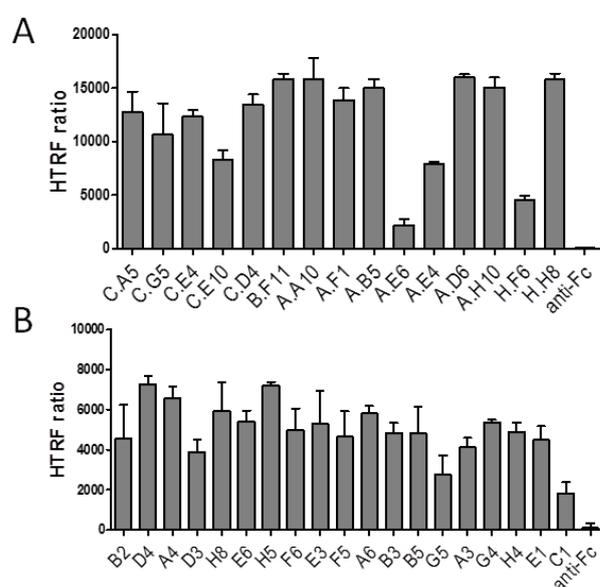


Figure 2: Specificity analysis of sdAbs selected on cell surface antigens by homogeneous time resolved fluorescence (HTRF) technology. A) Analysis of anti-HER2 sdAbs. Cells transfected by SNAP-tag HER2 and labeled with donor fluorophore were incubated with sdAbs and acceptor-labeled anti-6his mAb. sdAb binding, detected by FRET, is expressed as HTRF ratio to normalize results for the HER2 receptor density (see Materials and Methods). anti-Fc: anti human Fc sdAb used as negative control. **B)** Analysis of anti-mGluR4 sdAbs. SdAb targeting mGluR4 were characterized as described in A).

Figure 3

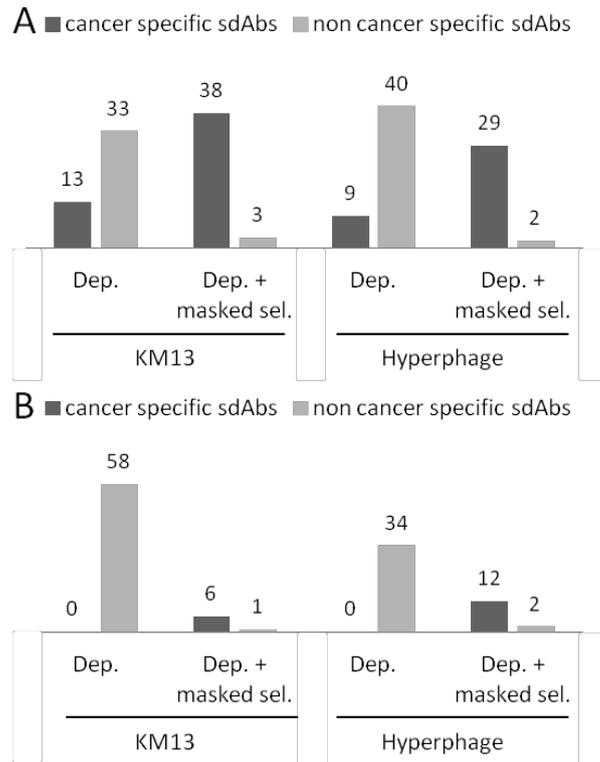


Figure 3: Screening of clones selected against overexpressed targets. A) Screening of clones selected against biopsy lysates. For each selection, 96 clones were randomly picked and assayed by phage ELISA for binding to biopsy or healthy cell lysates immobilized on microtiter plates. Clones positive on biopsy lysate and negative on normal lysate were considered cancer specific. Dep.: depletion. Dep. + masked sel.: depletion followed by selection performed in the presence of masking sdAbs. **B)** Screening of sdAbs isolated against intact breast cancer cells. For each selection, 96 clones were screened by phage-cytometry assay on a mixture of intact breast cancer cells (MDA-MB-231, MCF7, SKBr3, HCC1954). Bound phage-sdAb were detected using PE-conjugated anti-M13 mAb. Dep.: depletion. Dep. + masked sel.: depletion followed by selection performed in the presence of masking sdAbs.

Figure 4

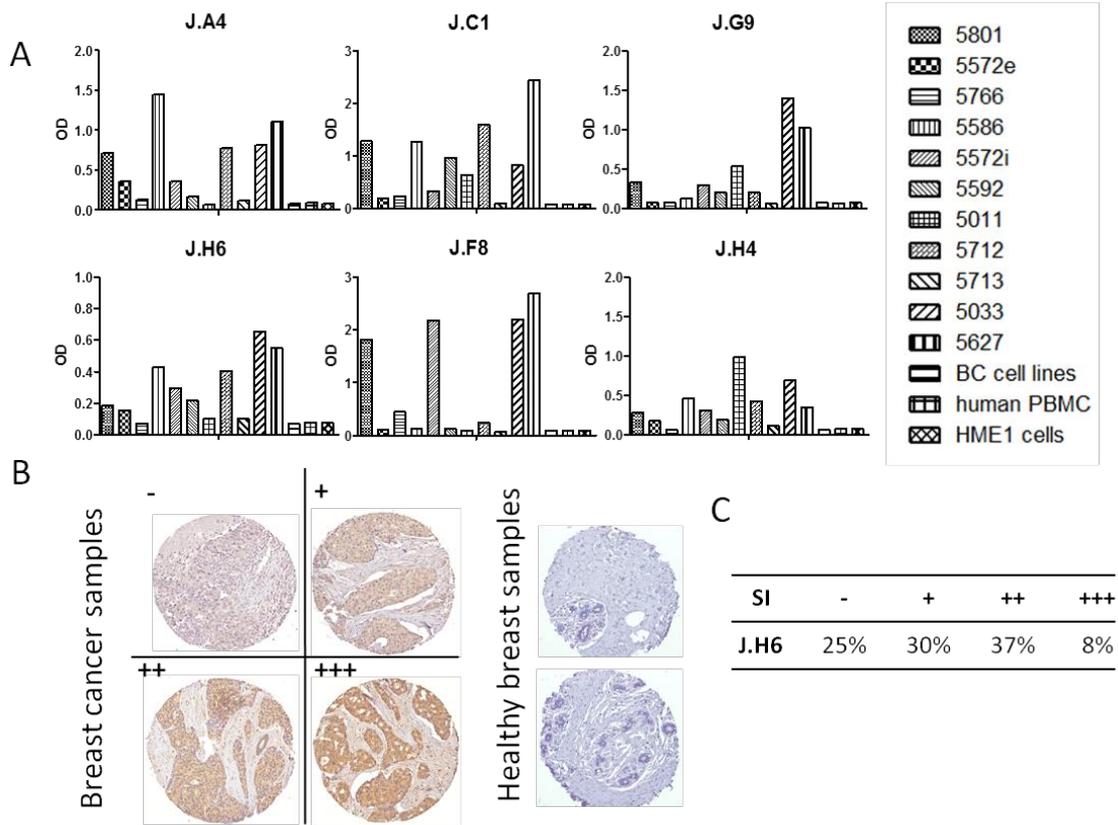


Figure 4: Fine characterization of candidate sdAbs isolated against biopsy lysates. A) Reverse phase phage-ELISA. Various biopsy lysates, a mixture of breast cancer cell lysates, (BC cell lines), a human PBMC lysate, and a healthy breast epithelial cell line HME1 lysate were coated on maxisorp. Phage-sdAbs were incubated and washed. Bound phage were detected using HRP-conjugated anti-M13 mAb. **B)** Tissue micro array analysis. Paraffin embedded slide containing 80 breast cancer samples or 14 healthy breast samples were incubated with purified and in vitro biotinylated sdAb J.H6. Bound sdAbs were detected using HRP-conjugated streptavidin. Representative examples are shown. **C)** Staining results were classified according to their intensity. SI: staining intensity.

Figure 5

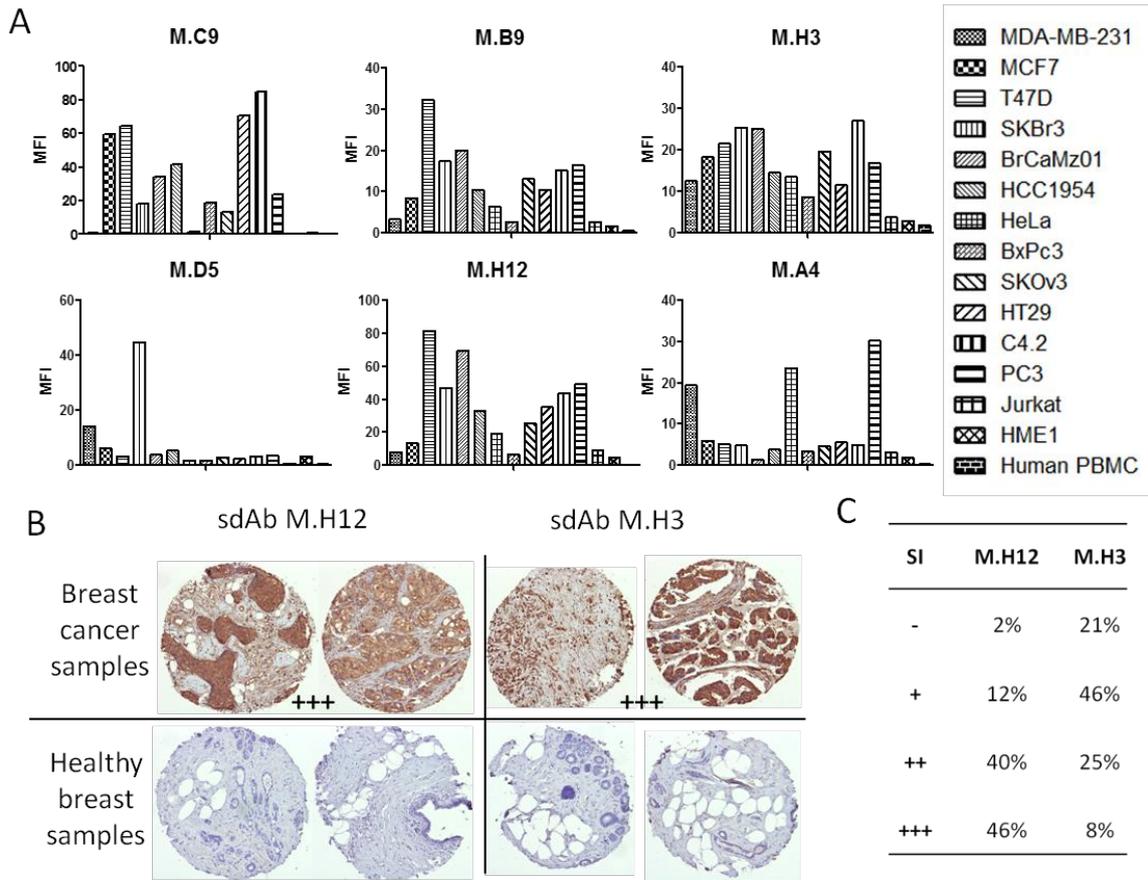


Figure 5: Fine characterization of candidate sdAbs against intact breast cancer cells. A) A cytometry assay was performed on 6 breast cancer cell lines, 7 cancer cell lines of various origins (cervical, pancreas, ovarian, colon, prostate, lymphocyte), on human PBMC and normal breast epithelium cell line HME1. In vitro biotinylated sdAb were added on cells. After washing, bound sdAbs were detected with PE-conjugated streptavidin. MFI: mean fluorescence intensity. **B)** Tissue micro array analysis. Paraffin embedded tissue array containing 80 breast cancer samples and 14 healthy breast samples were incubated with in vitro biotinylated sdAbs. Bound sdAbs were detected by HRP-conjugated streptavidin. Shown are representative examples. **C)** Staining results were classified according to their intensity. SI: staining intensity.

Figure S1

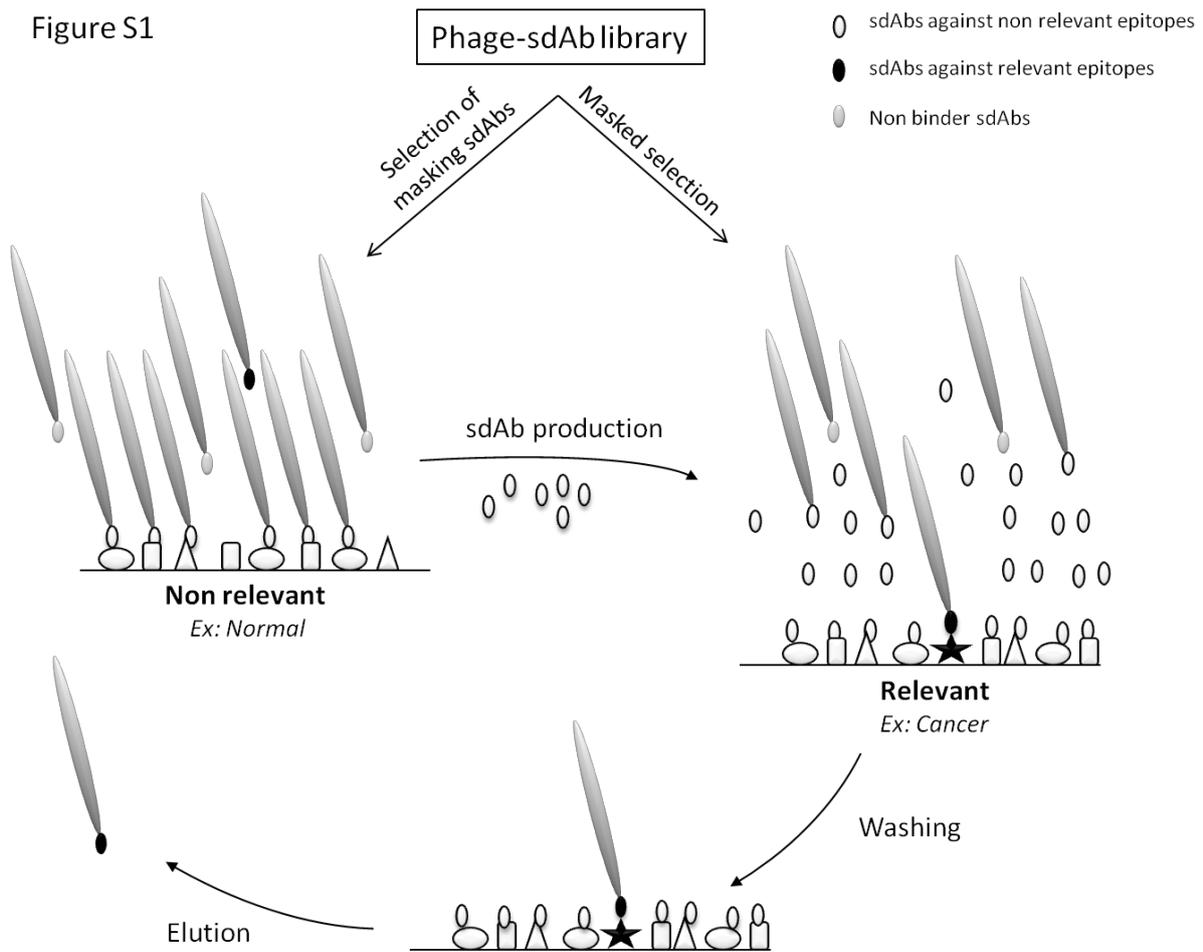


Figure S1: Scheme describing the masked selection procedure. Non relevant (normal) antigens are depicted as empty black shapes, immobilized onto a surface. Relevant (i.e. cancer specific) antigen is depicted as a full black star. A phage-sdAb library is used to select binders against the non-relevant sample. Corresponding sdAbs are produced, purified and added in a large excess during a second selection performed with the same library on the relevant sample. Only relevant epitopes are available for binding, leading to the preferential selection of binders against proteins or epitopes absent in the non relevant sample.

Figure S2

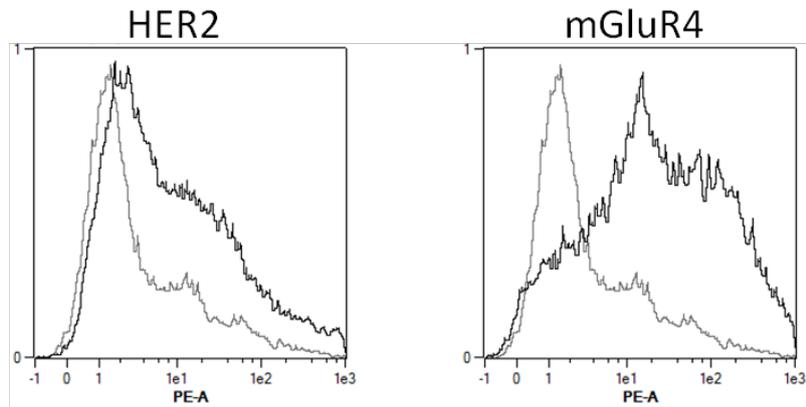


Figure S2: Transfection level. Expression HER2 or mGluR4 (fused to SNAP and Flag tag) on the surface of HEK cells was followed by flow cytometry. HER2-transfected HEK cells (HEK-HER2) and mGluR4-transfected HEK cells (HEK-mGLuR4) were incubated with anti-Flag mAb (black line) or control isotype (gray line). Captured antibodies were detected using PE-conjugated anti-mouse antibodies. Cells were analyzed by flow cytometry assay on a MACSQuant flow cytometer (Miltenyi). Histograms were overlaid and normalized for peak height to facilitate comparison.

Figure S3

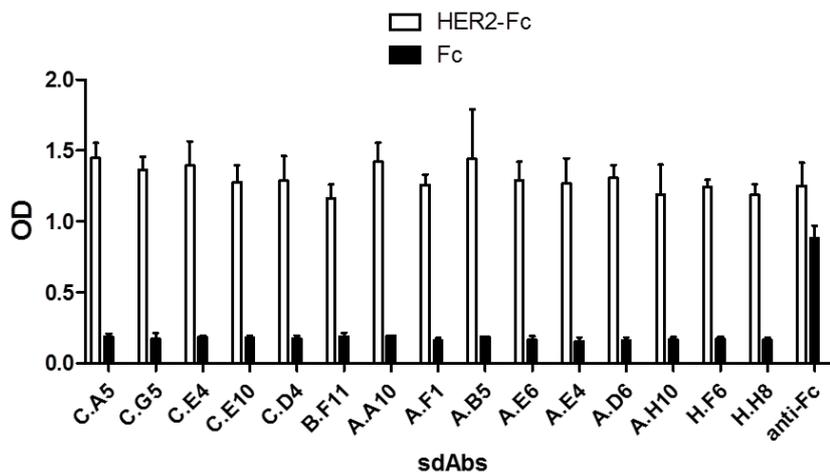


Figure S3: Specificity analysis of anti-HER2 sdAbs by ELISA. HER2-Fc recombinant fusion or human Fc portion were covalently immobilized on epoxy magnetic beads. Soluble sdAbs were incubated. After washing, bound sdAbs were detected using a HRP-labeled anti-6his mAb. anti-Fc: anti human Fc sdAb used as positive control.

Figure S4

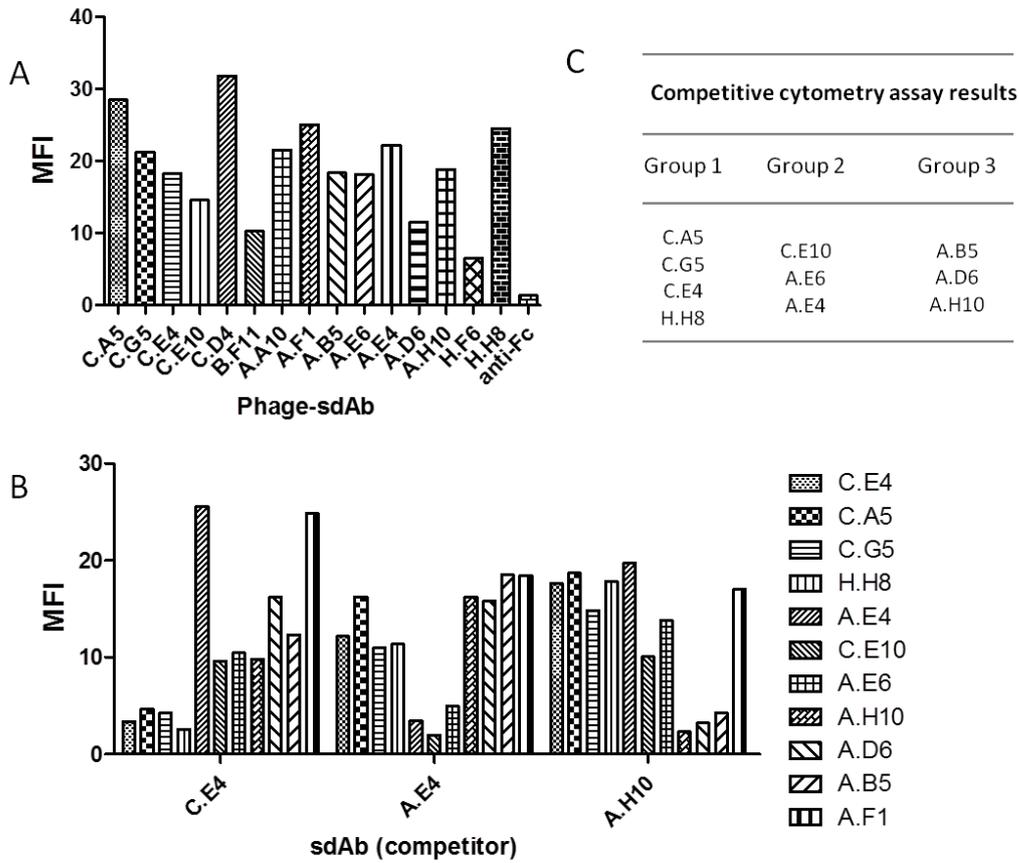


Figure S4: Characterization of anti-HER2 binders by flow cytometry. **A)** All selected phage-sdAbs were incubated with HER2⁺ SKOV3 cells. After washing, bound phage were detected using PE-conjugated anti-M13 mAb. Cells were analyzed by flow cytometry assay on a MACSQuant flow cytometer (Miltenyi). anti-Fc: anti-human Fc sdAb used as negative control. **B)** Competition flow cytometry assay. Cells were incubated with phage-sdAbs in the presence of an excess of soluble anti-HER2 sdAbs C.E4, A.E4 or A.H10. Bound phage were detected as in A). **C)** Phage-sdAbs and sdAbs able to compete (sharing overlapping epitopes) were classified into 3 groups.

Figure S5

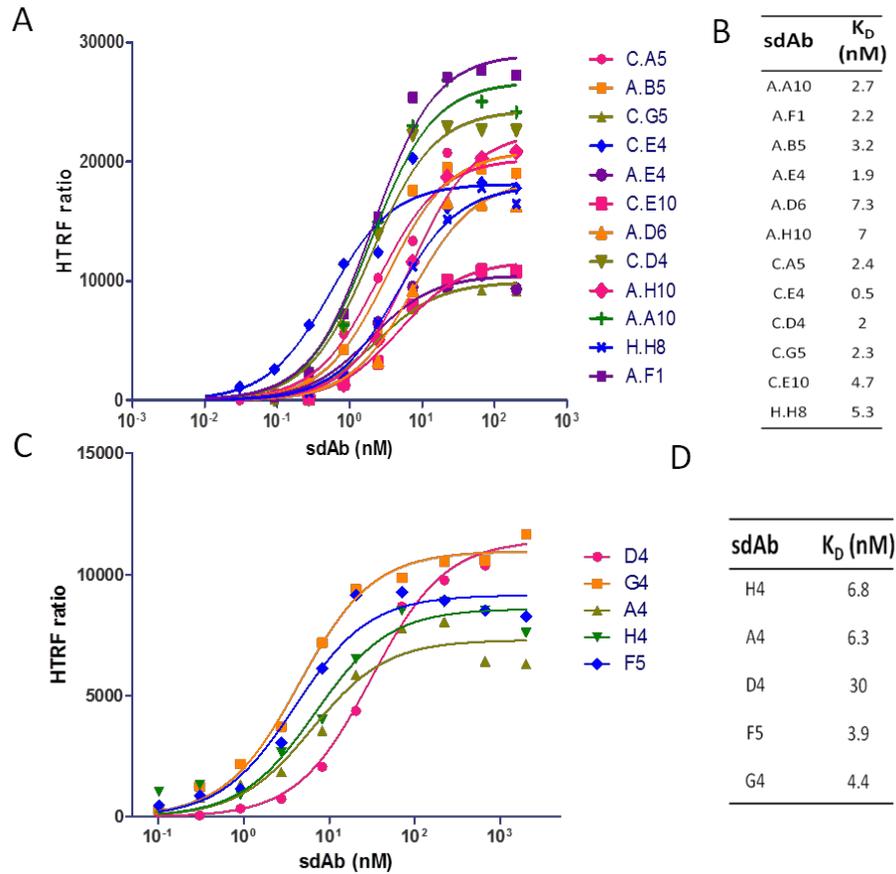


Fig S5: Affinity analysis of sdAbs selected on cell surface antigens by HTRF. Various concentrations of sdAbs were incubated on transfected and labeled cells and binding was followed by FRET as for Fig 2. Dissociation constants were calculated using a non-linear curve fitting software (Prism, GraphPad). A) Dose response curves obtained by anti-HER2 sdAbs incubated on cells transfected with SNAP-HER2 fusions. B) Calculated K_D of anti-HER2 sdAbs. C) Dose response curves obtained by anti-mGluR4 sdAbs incubated on cells transfected with SNAP-mGluR4 fusions. D) Calculated K_D of anti-HER2 sdAbs.

Figure S6

A					C				
Name	CDR1	CDR2	CDR3	Frequency	Name	CDR1	CDR2	CDR3	Frequency
J.A4	GDTFERYR	VTIDGAT	NALNREGPFEEY	x1	M.C9	GATFSRNI	ITWVRETT	AASVGSRLYGAYHKEGGYDY	x1
J.C1	GSIFSINF	IDSRGSLN	RSPGTGGDY	x45	M.B9	GPSFLLYA	ITYIGGST	AASGHSYSDSANQYDD	x1
J.D9	GSIKSIGT	ITSGGST	TADVLYMRKTYIYARDTF	x1	M.E10	TSVFSIDT	ITSGGST	KAITTRWDRSDSY	x1
J.F3	GRTEFNVA	INGSGSSI	AAVRWGGSRHNGKYDS	x1	M.D5	GSISSRNT	QASGSYI	YLSQYSGSY	x4
J.F8	GLTFANYH	ISRSDDTT	AAAPYWYGSAAVSDY	x1	M.D7	GMIFSNYG	ITRGGST	YANTN	x1
J.G9	GSIKSIGA	ITSGGST	TADVLYSGGGYARDAY	x1	M.H3	GIIVSIRS	ITGRGST	NTRRQPLP	x1
J.H6	GRTEFT	ITWSGLTT	AVKKRSPAGWTTSTADYDP	x1	M.H12	GSSISSIA	ISSGGTI	NTGRRLQTS	x1
J.H4	GRTEFDNYV	IIWSGGST	AAHPYGLIRLRHQPEYRY	x1	M.A9	GSIFEIND	ITRGRST	KADHSTYDNWENY	x1
J.G12	GFTEFIYY	IDSSGGST	ARGPGTSWYWPWGY	x1	M.A4	EISVSIKS	VISGRSP	NLHTWSGYDY	x1
					M.F5	ESTFSSNA	ISPGGSA	YSRFR	x2
					M.H11	GRTLSAYT	LVGSADNT	AAKWRTDYYRDPENYAY	x1

B							D						
Competitive ELISA results							Competitive cytometry assay results						
Group 1			Non competitive clones				Group 1			Group 2		Non competitive clones	
J.C1	J.D9	J.G12	J.A4	J.F8	J.G9	J.H6	M.H11	M.E10	M.A9	M.C9	M.B9	M.D5	
	J.F3				J.H4		M.A4	M.D7	M.H12	M.F5		M.H3	

Fig S6: Sequences and epitope analysis of sdAbs targeting overexpressed targets. A) Amino acid sequences and frequency of biopsy specific binders. Only complementarity determining regions CDR1, CDR2 and CDR3 are represented. **B)** Phage ELISA competition assays (in the presence of an excess of soluble sdAbs) were performed with all different biopsy lysate binders to determine competitive sdAbs sharing overlapping epitopes. **C)** Amino acid sequences and frequency of cell surface marker-specific sdAbs. Only CDR1, CDR2 and CDR3 are represented. **D)** A flow cytometry competition assay using phage-sdAbs in the presence of soluble sdAbs was performed to determine competitive clones.

3. Discussion

Après la construction de banques de sdAbs à partir de lamas immunisés avec des biopsies de cancer du sein, des sélections par phage display ont été réalisées sur des protéines solubles totales de lysats de biopsies de cancer du sein ou sur des cellules intactes de différentes lignées humaines de cancer du sein. Notre première approche a consisté à réaliser des sélections de façon classique, c'est-à-dire en réalisant une étape de déplétion de nos banques de phages sur un échantillon normal (non cancéreux) puis de sélection la sur l'échantillon d'intérêt (cancéreux). Nous nous sommes très vite rendu compte que ce type de sélection n'était pas suffisamment efficace. En effet, de nombreuses tentatives de sélections sur lysat n'ont conduit qu'à de très faibles pourcentages d'anticorps ciblant un antigène tumeur-spécifique. Pour les sélections sur cellules entières, les résultats sont encore plus drastiques car aucun anticorps spécifique des cellules tumorales n'a pu être isolé par cette stratégie. Pourquoi l'étape de déplétion se montre-t-elle si peu efficace ? L'utilisation du phage helper KM13 permet pourtant d'éliminer la grande majorité des phages ne présentant aucun anticorps, qui génèrent en général un fort bruit de fond. Le phénomène de déplétion (tout comme la sélection), repose sur des interactions antigène-anticorps. Ce sont donc des interactions non covalentes. Au cours d'une étape de déplétion, un équilibre entre phages liés et phages libres va donc s'installer. De ce fait, la déplétion ne pourra jamais être totale. Une stratégie, déjà connue, pour essayer d'améliorer cette étape de déplétion, est l'utilisation du phage helper « hyperphage », qui conduit à la production de phage ayant pour la plupart plusieurs copies de la fusion fragments d'anticorps-protéine p3 du phage. La multivalence ainsi générée devrait donc déplacer l'équilibre vers la forme liée. Mais nous avons pu observer au cours de nos expériences que l'utilisation de ce phage helper ne permettait pas une efficacité suffisante de la déplétion pour nos stratégies complexes.

C'est au cours de nos sélections sur lysat que nous avons observé un phénomène intéressant qui a guidé la suite de nos expériences. Nous avons remarqué que l'ajout de sdAbs, préalablement sélectionnés et purifiés sous forme soluble, durant une sélection par phage display permettait de cacher les épitopes reconnus par ces sdAbs, permettant ainsi la sélection de phage-anticorps ciblant d'autres épitopes moins dominants. Cette observation nous a donc permis de réaliser une nouvelle stratégie de sélection tout à fait innovante. Après des premières sélections sur un échantillon non spécifique du cancer, nous avons produit en

masse les sdAbs isolés afin de les utiliser comme compétiteurs dans les sélections sur échantillons cancéreux. Nous avons appelé cette stratégie la sélection masquée. Ce système nous a permis d'obtenir avec un bon rendement des sdAbs spécifiques du cancer du sein. L'efficacité de la stratégie a été vérifiée en sélection sur lysat mais également sur cellules entières, où aucun anticorps spécifique n'avait pu être isolé par des déplétion/sélection classiques. Après ces sélections, les anticorps ont été caractérisés en termes de séquence et de reconnaissance d'épitope, et leur spécificité a été vérifiée et validée dans le cancer du sein par différentes approches telles que l'ELISA, la cytométrie de flux ou encore l'immunohistochimie. Il serait maintenant intéressant de pouvoir vérifier leur spécificité dans un contexte plus général, par exemple en réalisant des expériences d'immunohistochimie avec différents tissus provenant d'organes sains et cancéreux.

Ensuite, pour confirmer l'efficacité de notre système de sélection masquée et surtout pour démontrer son universalité, nous avons choisi de réaliser des sélections sur un antigène recombinant correspondant à l'ectodomaine du récepteur HER2 fusionné à un Fc humain (HER2-Fc). En effet, l'antigène HER2 est une cible majeure en ce qui concerne la thérapie du cancer du sein, et il était donc tout à fait cohérent pour nous de travailler sur cette dernière. Notre but était de cibler un épitope de l'ectodomaine de HER2 en éliminant tous les anticorps ciblant le Fc. Ces derniers sont très présents dans nos banques car les lamas ont été immunisés avec différentes protéines de fusion ayant toutes en commun le Fc humain, un fragment très immunogène. Pour valoriser notre approche, nous avons comparé la sélection masquée aux stratégies classiques déjà existantes telles que la déplétion avec l'utilisation de différents phages helper. Dans ces expériences sur antigène recombinant, nous avons pu démontrer un gain notable d'efficacité du système de masque, conduisant à plus de 90% d'anti-HER2. En effet, nous avons pu isoler des anticorps anti-HER2 avec un meilleur rendement en utilisant notre stratégie de sélection masquée, en réduisant drastiquement le nombre d'anti Fc par rapport à une stratégie de déplétion (de 3 à 30%).

Pour continuer la valorisation de notre approche, nous avons réalisé des expériences en travaillant uniquement avec des cellules transfectées, que ce soit pour l'immunisation, les sélections ou le criblage. L'utilisation de cellules transfectées permet de travailler sur des récepteurs qui ne peuvent être produits sous une forme recombinante, tels que les récepteurs couplés aux protéines G ou des canaux ioniques. Le travail sur cellules transfectées permet également de travailler sur des récepteurs sous leur conformation native et physiologique. En effet, la production d'une protéine sous forme recombinante peut altérer sa conformation. Or, l'isolement d'anticorps reconnaissant une protéine sous sa conformation physiologique est

une condition cruciale en diagnostic et thérapie. Sur ce modèle de travail, nous avons travaillé avec plusieurs récepteurs : HER2 et mGluR4. Des études récentes ont démontré l'expression ectopique de plusieurs membres de la famille récepteurs au glutamate, dont mGluR4, dans différents cancers (Chang, Yoo et al. 2005; Speyer, Smith et al. 2011). Dans ce cas, nous avons à nouveau démontré l'efficacité de notre système en le comparant aux stratégies déjà existantes. Concernant l'antigène HER2, faiblement exprimé par les cellules, la sélection masquée nous a permis d'isoler plus de 25% d'anticorps anti-HER2, alors que les stratégies de déplétion que ce soit avec le phage helper KM13 ou l'hyperphage, ne permettaient d'isoler que 8 % d'anticorps anti HER2. Pour le récepteur mGluR4, fortement exprimé par les cellules, la sélection masquée a permis d'isoler plus de 90 % d'anticorps spécifiques. Ces résultats démontrent à nouveau l'efficacité de cette nouvelle stratégie, que ce soit pour des récepteurs bien exprimés ou des récepteurs moins représentés à la surface des cellules.

La sélection masquée est donc une stratégie de sélection très efficace et universelle qui ouvre de nombreuses portes dans le domaine de l'isolement de nouveaux anticorps spécifiques.

Partie III :

Utilisation des sdAbs pour le diagnostic du cancer du sein

1. Introduction : Les sdAbs pour le diagnostic du cancer du sein

Comme je l'ai décrit au cours de l'introduction, les sdAbs peuvent être utilisés de façon efficace dans de nombreuses applications. Dans le cadre du diagnostic du cancer du sein, de nombreuses techniques d'immunodosage sont utilisées à l'heure actuelle. Nous pouvons citer comme exemple les tests ELISA pour le dosage de l'ACE circulant ou l'immunohistochimie pour la caractérisation d'une tumeur pour l'expression des récepteurs hormonaux (œstrogène et progestérone). Il existe également de nouvelles techniques émergentes utilisant les anticorps comme les puces à anticorps et l'immunoenrichissement ou l'immunodétection de CTC. La plupart de ces techniques utilisent des anticorps monoclonaux. Ces anticorps ont démontré leur efficacité en termes de spécificité, mais présentent de nombreuses limitations. Par exemple, leur isolement par la technique des hybridomes est lourd et coûteux, leur production à grande échelle peut être fastidieuse, et pour finir, leur stabilité peut être une limite importante, par exemple pour l'élaboration d'une puce à anticorps.

En se basant sur ces observations, nous avons donc décidé qu'il était primordial de trouver une autre source d'anticorps qui permettrait de lever toutes ces limitations. Dans ce but, nous avons démontré l'utilisation simple, rapide et efficace de sdAbs dans différentes applications diagnostic dans le cadre du cancer du sein. Après la sélection d'anticorps de cibles inconnues mais spécifiques du cancer du sein sur des échantillons complexes, nous avons également voulu isoler un sdAb contre un antigène validé pour le diagnostic et la thérapie du cancer du sein qui est le récepteur HER2. L'isolement d'un anticorps simple domaine anti-HER2 était essentiel pour notre démarche. Nous avons ensuite démontré la capacité de ces anticorps isolés à être utilisés dans de nombreuses applications. Les premières applications concernent les techniques diagnostiques classiques telles que l'ELISA, l'IHC et la cytométrie de flux. Par la suite, des applications plus originales ont pu être réalisées. Tout d'abord, nous avons montré la possibilité d'identifier un des antigènes reconnus par un de ces sdAbs. La disponibilité de l'anticorps nous a permis de réaliser des immunoprécipitations

pour purifier et identifier l'antigène par spectrométrie de masse. Nous avons ensuite élaboré une puce à sdAbs modèle en phase liquide pour l'analyse multiplexée d'antigènes tumoraux. Pour finir, nous avons utilisé les sdAbs pour l'immunoenrichissement de cellules rares dans un échantillon complexe.

L'ensemble de ces résultats a permis de réaliser une publication présentée dans la suite de cette partie.

2. Article 3

Single-domain antibodies: a versatile and rich source of binders for breast cancer diagnostic approaches

Single-domain antibodies: a versatile and rich source of binders for breast cancer diagnostic approaches†

Klervi Even-Desrumeaux,^{abcd} Patrick Fourquet,^e Véronique Secq,^{abcd}
Daniel Baty^{abcd} and Patrick Chames^{*abcd}

Received 27th February 2012, Accepted 20th June 2012

DOI: 10.1039/c2mb25063b

Noninvasive early detection of breast cancer through the use of biomarkers is urgently needed since the risk of recurrence, morbidity, and mortality is closely related to disease stage at the time of primary surgery. A crucial issue in this approach is the availability of relevant markers and corresponding monoclonal antibodies suitable for the development of effective immunodiagnostic modalities. The identification of such markers from human pathological lesions and the isolation of specific antibodies using conventional approaches remain major challenges. Camelids produce functional antibodies devoid of light chains in which the single *N*-terminal domain of the heavy chain is fully capable of antigen binding. When produced as an independent domain, these so-called single-domain antibody fragments (sdAbs) or nanobodies have several advantages for biotechnological applications owing to their unique properties of size (13 kDa), stability, solubility, and expression yield. In this work, we have generated phage display libraries from animals immunized with breast cancer biopsies. These libraries were used to isolate sdAbs against known and relevant antigens such as HER2, or several cancer-specific sdAbs against unknown targets. We describe the identification of one these targets, cytokeratin 19, using affinity purification in combination with mass spectrometry. Some of these sdAbs were used in several straightforward diagnostic applications such as immunohistochemical analysis of tumor samples, multiplexed cytometric bead array analysis of crude samples, or an immune enrichment procedure of rare cells. Here, we demonstrate that phage display-based selection of single-domain antibodies is an efficient and high-throughput compatible approach to generate binders with excellent characteristics for the fast development of diagnostic and prognostic modalities.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer among women in Western countries. In France, 41 000 new cases are diagnosed each year and 25% of these women are below the age of 50. Breast cancer has a heterogeneous behavior and the frequency of metastasis in regional lymph nodules depends on tumor types.¹ Overall survival in breast cancer patients has been improved by the development of screening and treatment methods. While the 1980s saw a sharp rise in the number of new cases of breast cancer, that number now appears to have stabilized.¹ The drop in the death rate from breast cancer is

probably due to the fact that more women are undergoing mammography. When detected early, the chances for successful treatment of breast cancer are considerably improved.

However, the early diagnosis of breast cancer and an appropriate follow-up after surgical treatment are still major issues in the treatment of breast cancer. Mammographic imaging is the most effective approach to the diagnosis of breast cancer in women older than 50 years of age. Although new improvements are being made in the resolution of these imaging techniques, tumors smaller than 5 mm usually go undiagnosed,² and high-grade tumors can evolve very significantly during the interval between two check-ups of regular mammography imaging, *i.e.* one to two years. For these reasons, new approaches are urgently needed to improve the early diagnosis of breast cancer and the overall and disease-free survival rates of patients.

Many studies have demonstrated significant variations in the expression level of several proteins during cancer development. These changes may cause measurable alterations of cancer cells and secretion of marker proteins into body fluids such as serum.

^a *Inserm, U1068, CRCM, Marseille, F-13009, France.*
E-mail: patrick.chames@inserm.fr; Fax: +33 4 91826083;
Tel: +33 4 91828833

^b *Institut Paoli-Calmettes, Marseille, F-13009, France*

^c *Aix-Marseille Univ, Marseille, F-13284, France*

^d *CNRS, UMR7258, CRCM, Marseille, F-13009, France*

^e *CIML, Marseille, F-13288, France*

† KE-D performed most experiments, DB, KE-D and PC designed the experiments, KE-D and PC wrote the manuscript, VS provided biological samples, PF performed MS experiments.

Such tumor markers for breast cancer used in the clinic include cancer antigen 15-3 (CA 15-3), carcinoembryonic antigen (CEA),³ and HER2.⁴ Antibody-based techniques such as immunohistochemistry (IHC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are widely used for detecting several antigens such as HER2, CEA, CA15-3 or hormonal receptors. For example, HER2 is a 185 kDa protein composed of three domains: a cytoplasmic domain, a transmembrane domain, and an extracellular domain (ECD). The ECD of HER2 can be cleaved from the surface of breast cancer cells by matrix metalloproteases and released into the serum. Increased levels of ECD ($\geq 15 \text{ ng mL}^{-1}$) can be detected in approximately 15% to 30% of unselected presurgical breast cancer samples and in up to 45% of patients with metastatic breast cancer.⁵ Measuring HER-2 is important for selecting optimal therapy and predicting prognosis in breast cancer patients. Current methods for evaluating HER-2 include the detection of shed antigen in the serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),⁶ or the analysis of protein overexpression by IHC. IHC is now frequently used in the evaluation of many epithelial proliferations. Improved antigen retrieval techniques and a better understanding of biology have contributed to the broader utility of IHC in solving everyday diagnostic problems in breast pathology.⁷

In addition, new emerging antibody based approaches are now in development for breast cancer diagnosis. For example, microarray multiplex protein measurement by biomarker-based molecular diagnostic and prognostic cancer testing assays is destined to become a large growth segment of the immuno-diagnostic industry. Protein microarrays are among the novel class of rapidly emerging proteomic technologies that might lead to efficient and specific diagnosis.⁸ Microbead protein arrays use surface-coupled capture molecules and flow cytometry to simultaneously quantify several antigens. Multiplexing is achieved by either using different sized microbeads or color coding that is readable by a laser-induced fluorescent detection system.⁹ This latter approach is suitable for the analysis of up to a hundred different bead-bound antibodies and/or proteins in a complex mixture. These assays can be directly compared to the ELISA method,¹⁰ but they require smaller volumes of sample material, and can be multiplexed. Thus bead array represents the method of choice for low density antibody array for clinical use such as diagnosis or prognosis.^{11,12} This technique has the potential to generate non-invasive and high-throughput assays for screening and follow-up of large populations of women.

Another emerging and interesting diagnostic approach is the detection of circulating tumor cells (CTC) as an indicator of metastatic disease. Their detection is expected to provide a powerful tool for cancer prognosis, diagnosis of minimal residual disease, assessment of tumor sensitivity to anticancer drugs, and personalization of anticancer therapy.¹³ CTC detection in blood samples may also be used to diagnose cancer and monitor a patient's response to therapy. Since CTCs are rare, comprising about one tumor cell among billions of normal blood cells in advanced cancer patients,¹⁴ their detection and enumeration is a difficult task. Breast cancer circulating tumor cells are typically extracted from circulation through positive selection using epithelial cell-adhesion molecules (EpCAM) or HER2 as markers, leading to currently unknown

biases when cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition.¹⁴ To increase the specificity of this assay, one solution could be to use a large panel of antibodies targeting several membrane tumor antigens.

All these approaches are dependent on the availability of a variety of specific monoclonal antibodies (mAbs). Unfortunately, it is not always easy to identify non-cross reactive mAbs against a large variety of markers. Moreover, their high production cost and their stability after immobilization are limiting factors for the development of some diagnostic assays.^{15,16} The availability of large libraries of recombinant antibody fragments such as single chain Fv (scFv) or Fab is especially suited for these approaches but the stability and production yield of these fragments remain a limiting factor.¹⁷ In 1993, Hamers-Casterman *et al.*¹⁸ discovered that sera of camels, dromedaries and llamas contain a unique type of antibody devoid of light chains. Camelids produce functional antibodies devoid of light chains (HCAbs). Single domain antibodies (sdAbs), corresponding to the variable domain of these antibodies, have several advantages for biotechnological applications^{19,20} thanks to their unique properties including a small size (13 kDa), a high stability even in the absence of disulfide bond formation,²¹ a high solubility, and high expression yields.²² Phage display technology has been extensively used to isolate tumor specific antibodies that are able to bind their cognate antigens in the cellular context.^{23–29} It can be used to isolate binders against tumor specific markers.^{30–35}

In this study, we have used phage display to isolate several relevant anti-tumor marker sdAbs from immunized libraries. The straightforward use of these sdAbs for diagnostic approaches is also presented, including conventional assays such as ELISA or IHC, and also more innovative approaches such as multiplexed analysis of a complex sample by cytometric bead array (CBA) and the enrichment of rare cells in a complex sample by magnetic beads followed by flow cytometry characterization.

Results

Selection of phage antibodies

Phage display was used to isolate antibodies against breast cancer-specific targets. Various selection strategies were applied to obtain sdAbs against known and unknown targets.

Selection of anti-HER2 sdAbs. Although breast cancer is a very heterogeneous disease, 20–30% of tumors overexpress the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2).³⁶ SdAbs against this target are thus highly relevant for a diagnosis approach. To isolate such sdAbs, a llama was immunized with the HER2-expressing ovarian cancer cell line SKOv3 and a sdAb library was built and used to perform biopannings. The first round of selection was performed on a purified recombinant HER2 ectodomain fused to a human Fc portion (HER2-Fc) followed by a second round on an HER2-positive SKBr3 cell line. After selection, 188 clones were screened and 92 clones were found to be positive by ELISA on HER2 positive cells (data not shown). Twenty clones were analyzed by sequencing, and all of them corresponded to a unique clone named C7b. The fine specificity of this clone was confirmed by ELISA (Fig. 1A). SdAb C7b specifically bound to HER2-Fc fusion but not to an irrelevant Fc fusion, demonstrating its specificity for the HER2 ectodomain.

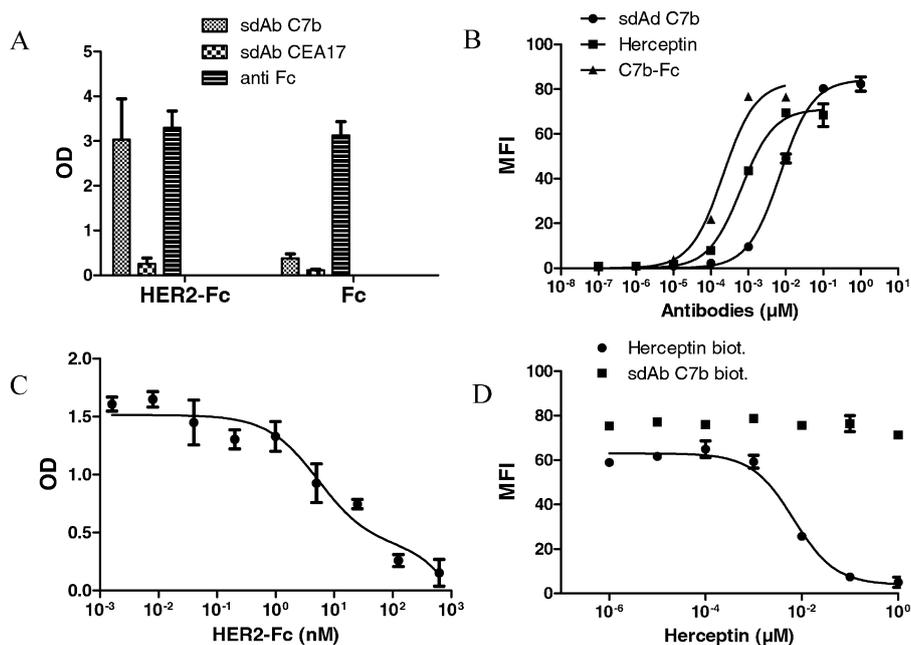


Fig. 1 sdAb C7b specificity and affinity. (A) Epoxy beads were coated with HER2-Fc or Fc antigen, and incubated with anti-HER2 (C7b) or anti-CEA (CEA17) *in vivo* biotinylated sdAbs. Bound sdAbs were detected with HRP-conjugated streptavidin. HRP-conjugated anti-Fc mAbs were used as the positive control of the presence of Fc fragments on beads. (B) SKBr3 cells were incubated with serial dilutions of *in vitro* biotinylated sdAb C7b (●), Herceptin (■), or C7b-Fc (▲). Captured antibodies were detected by PE-conjugated streptavidin. Cells were analyzed by flow cytometry assay on MACSQuant. Error bars represent the standard deviation of MFI (mean fluorescence intensity) of experiments performed in triplicates. K_D values were determined using the non-linear fitting program Prism (GraphPad) (C) $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ of *in vitro* biotinylated sdAb C7b was incubated with various concentrations of the soluble HER2-Fc antigen. The free fraction of biotinylated sdAb was measured by incubation with beads coupled to HER2-Fc followed by washing and detection using streptavidin–HRP. Error bars represent the standard deviation of experiments performed in triplicates. (D) SKBr3 cells were incubated with serial dilutions of Herceptin (1 to 0.000001 μM). *In vitro* biotinylated Herceptin at 0.001 μM (●) or sdAb C7b at 0.01 μM (■) was added. Captured antibodies were detected using PE-conjugated streptavidin. Cells were analyzed by flow cytometry assay on MACSQuant. Error bars represent the standard deviation of experiments performed in triplicates.

Next, we used a flow cytometry based assay³⁷ to determine the affinity of this sdAb on cells naturally overexpressing HER2, and compared it to the affinity of a dimeric version of this sdAb (obtained by Fc fusion and called C7b-Fc) and to that of the FDA-approved anti-HER2 monoclonal antibody (Herceptin/trastuzumab) (Fig. 1B). The precise K_D values were determined using the non-linear curve fitting program Prism (GraphPad). The affinity of the monovalent sdAb was 7 nM, 11-fold less than the bivalent herceptin affinity determined in parallel (600 pM). However, the measured affinity of C7b-Fc, a bivalent format of sdAb C7b directly comparable to Herceptin (bivalent IgG), was 200 pM, *i.e.* three-fold higher than that of Herceptin (Fig. 1B). To confirm the affinity of sdAb C7b using an independent approach, a competitive ELISA using the recombinant HER2-Fc antigen in solution was set up. The calculated K_D of 5.3 nM (Fig. 1C) was in close agreement with the flow cytometry data.

Finally, we performed a competitive analysis by flow cytometric assay between sdAb C7b and Herceptin (Fig. 1D). A large excess of Herceptin could not compete out sdAb C7b, demonstrating that these two molecules do not share their epitopes.

Selection of breast cancer-specific sdAbs of unknown specificity.

To select binders against unknown breast cancer markers, llamas were immunized with breast cancer biopsy lysates. Phage libraries were built and panned using various approaches.

Several selections were performed on different samples including a mixture of 9 breast cancer cell lines (BT474, SKBr3, HCC1954, MCF7, MDA-MB-231, T47D, HCC1806, BRCA-Mz-01, HCC1937) and a mixture of 11 biopsy lysates (5801, 5772e, 5766, 5586, 5572i, 5592, 5011, 5712, 5713, 5033, 5627). After two rounds of panning, a primary screening was performed by phage-sdAb ELISA on maxisorp-adsorbed lysates corresponding to each selection. Positive clones were selected to perform a secondary screening step against 11 breast cancer biopsy lysates, a mixture of 9 breast cancer cell line lysates, one healthy breast cell line (HME1) as control of cancer specificity, and PBMC (peripheral blood mononuclear cells) lysate from one patient as control of epithelial cell specificity. A final set of 20 unique clones were selected based on the diversity of their phage ELISA profiles on breast cancer cell lines and biopsies and for their specificity of cancer samples. Fig 2A shows representative examples of these various patterns, including a clone binding to an antigen differentially expressed in biopsies and cell lines, but negative on PBMC lysate (KE9), a clone showing a specificity restricted to breast cancer lysates and yielding no signal on biopsy lysates (KE36), or clones able to bind biopsy lysates but not cell line lysates (KE21 and KE15).

To establish the possibility of using sdAbs in diagnostic assays without the need of conventional mAbs, we tested the possibility of setting up a sandwich ELISA using a couple of

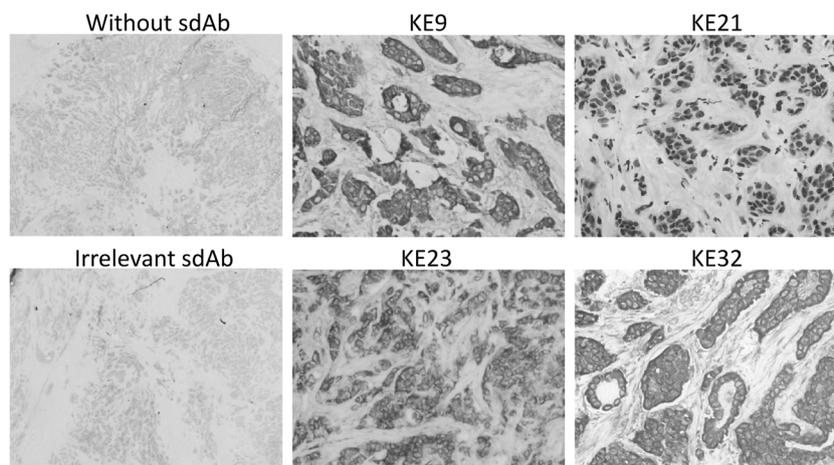


Fig. 4 Immunohistochemical assay. Frozen embedded ductal breast cancer tissue slides, corresponding to different samples, were incubated with *in vivo* biotinylated sdAbs. Bound sdAbs were detected using HRP-conjugated streptavidin. Original magnification, $\times 20$.

in IHC, we tested their reactivity on frozen embedded ductal breast cancer tissues (unrelated to biopsies used for immunization). As shown in Fig. 4, four sdAbs yielded intense stainings. Interestingly, various patterns could be obtained. SdAbs KE9, KE23, and KE32 stained the cytoplasm of epithelial tumor cells whereas sdAb KE21 yielded a strong signal restricted to the nucleus of tumor cells. No staining was obtained in the absence of sdAb or using an irrelevant sdAb. These results demonstrate that these sdAbs can be efficiently used to detect their antigen within this setting, independently of the cellular localization of their antigen.

Multiplexed analysis using single domain antibodies immobilized on fluorescent beads

This straightforward selection approach by phage display opens the possibility of rapidly selecting a variety of binders against various cancer samples and using the selected binders as binding units to establish highly sensitive and quantitative diagnostic approaches. Therefore, we aimed at using the previously characterized binders to elaborate a multiplexed diagnostic assay for complex but precious samples such as biopsy lysates or patient serum.

As a proof of concept, we decided to use previously isolated sdAbs against tumor markers HER2 and CEA,²⁵ together with the anti-KRT19 sdAb and the couple of sdAbs KE23/32 to build up a cytometric bead array assay. This approach uses the broad dynamic range of fluorescence detection offered by flow cytometry and antibody-coated beads to efficiently capture analytes. Each type of bead in the array is coded with a unique fluorescence intensity, and is functionalized with a different sdAb, so that beads can be mixed and run simultaneously in a single tube. Four types of commercially available fluorescent beads were coated with streptavidin to immobilize *in vivo* biotinylated sdAbs on their surface in an orientated fashion.³⁸ For this proof of concept, a complex sample was prepared by mixing patient serum containing a previously determined concentration of CEA, a purified recombinant HER2-Fc fusion, and the breast cancer biopsy lysate 5712 containing KRT19 and the unknown target. To evaluate the sensitivity of this approach, the precise concentration of KRT19

contained in this lysate was first established by traditional sandwich ELISA by comparison with a standard curve obtained using the purified antigen (data not shown). All four antigens were simultaneously detected using the corresponding mAb for known targets or phage-sdAb (KE32) for the unknown target. As seen in Fig. 5A, all antigens could be simultaneously detected with high sensitivity using a small amount (50 μ L) of complex sample.

Magnetic enrichment of rare cells using single domain antibodies

Streptavidin microbeads (Miltenyi Biotech) compatible with MACSQuant magnetic columns were used to evaluate the potential of biotinylated sdAbs as capture reagents for the enrichment of rare cells. As a proof of concept, anti-HER2 sdAb C7b was used to enrich breast cancer cells (SKBr3) from a large excess of human PBMC. A SKBr3 : PBMC ratio of $3 \times 10^3 : 6 \times 10^6$ was chosen to mimic the proportion of CTC in blood. The enrichment was monitored by following the percentage of HER2 positive cells using Herceptin. This simple procedure led to 276-fold enrichment of tumor cells compared to the initial ratio (Fig. 5B). Impressively, more than 97% of HER2 positive cells could be retrieved despite the 2000-fold initial excess of PBMC.

Discussion

In this paper, we describe the selection of anti-tumor marker sdAbs and their straightforward use in several applications. Using the same library generated by immunization of llamas with breast cancer biopsies, we selected sdAbs against known and relevant antigens such as HER2, or various sdAbs against unknown targets. Finally, some of these sdAbs were used to elaborate a sensitive and specific multiplexed assay on CBA to analyze a complex breast cancer representative sample. Other applications such as classical immunohistochemistry and an efficient and specific immune-enrichment of rare cells are also shown.

Surprisingly, a direct coating of cell lysates used for selections on maxisorp 96-well plates could be used to characterize the binding specificity of selected clones against a wide range of cell

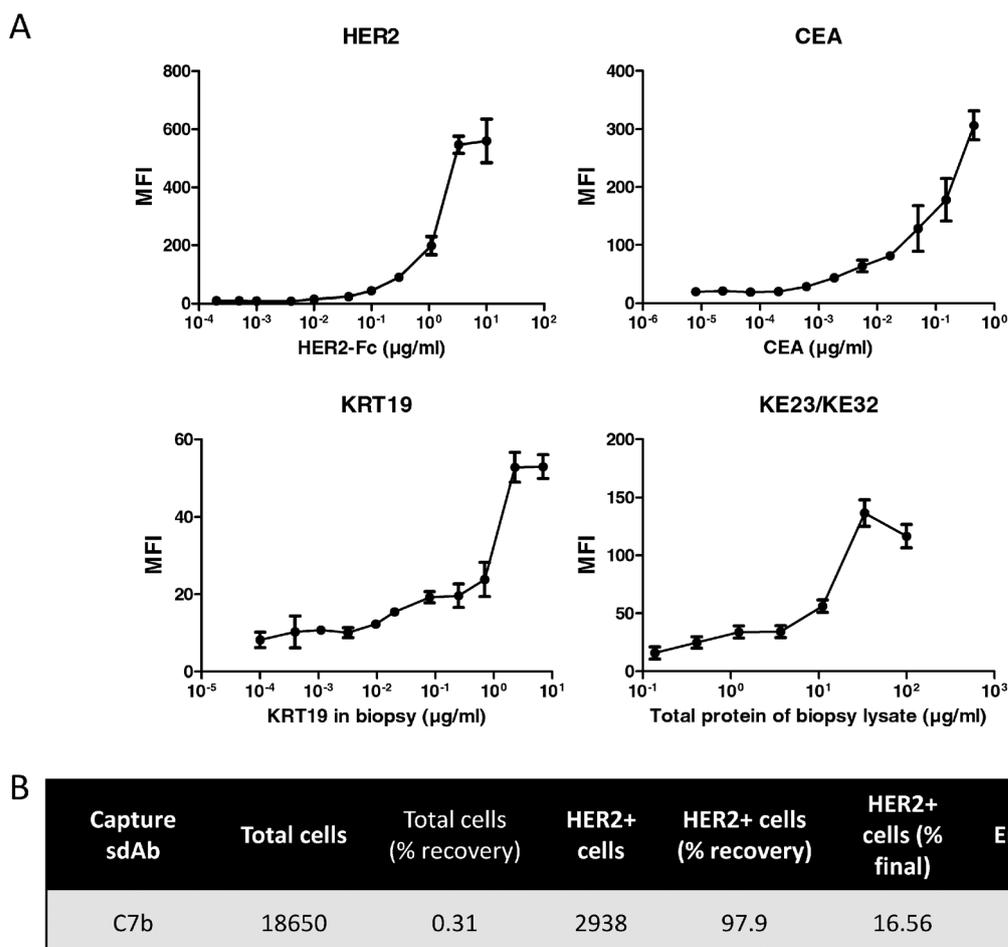


Fig. 5 Breast cancer diagnosis assay with sdAbs. (A) Multiplexed analysis of four breast cancer specific targets in a complex sample using a CBA assay. CBA beads were coated with streptavidin and incubated with *in vivo* biotinylated sdAb C7b, CEA17, KE9, or KE23. All beads were mixed and incubated with serial dilutions of serum containing CEA (starting concentration: 500 ng mL^{-1}), HER2-Fc antigen (starting concentration: $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), and biopsy 5712 lysate (starting concentrations: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of total protein and $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ of KRT19). Beads were incubated with phage-sdAb KE32, anti-CEA, anti-HER2, and anti-KRT19 mouse antibody. Anti-M13 mAb was added, followed by PE-conjugated goat-anti-mouse mAb. Beads were analyzed by flow cytometry assay on MACSQuant. Error bars represent the standard deviation of MFI (mean fluorescence intensity) of experiments performed in triplicates. (B) Enrichment of rare cells. Enrichment of the initial mixture of SKBr3 cells (3000) in human PBMC (6000000) yielding an initial ratio of 0.05% of cancer cells. Cancer cells were enriched using *in vitro* biotinylated anti-HER2 sdAb C7b loaded on streptavidin microbeads, and detected using Alexa660 labeled Herceptin. The enrichment procedure was performed on the MACSQuant cytometer and analyzed by flow cytometry on the same device.

line and biopsy lysates. The high complexity of these lysates and the possible conformational changes of antigens due to the adsorption process might have prevented the generation of strong signal for the monoclonal phage ELISA screening assay. We found that most selected phage clones could properly bind their antigens under these conditions. Bound phages were detected using an HRP-labeled monoclonal antibody directed toward p8, present at around 2800 copies per phage particle and allowing considerable signal amplification. As such, phage ELISA on immobilized lysates represents a sensitive, robust, inexpensive and HT-compatible reverse phase array assay that can be exploited to test hundreds of binders against dozens of cell lysates. This approach could be used to generate antigenic profiles of various cancer related samples including cell lines, biopsies or fluids such as serum samples.

We have shown the possibility of identifying the antigen recognized by the selected phage-sdAbs. In a previous work,

we had demonstrated the feasibility of producing active sdAbs in the cytoplasm of *E. coli*, fused to the avitag, a 15 amino acid sequence which is biotinylated on a single lysine by the *E. coli* enzyme BirA. This approach allows the efficient and inexpensive production of biotinylated sdAbs which can be directly immobilized on streptavidin coated surfaces, such as plates or beads, in a near covalent and oriented fashion.³⁸ Here we have used this approach to immobilize sdAbs on magnetic streptavidin beads to immunoprecipitate the corresponding antigen. This approach was significantly more efficient than other ones, including the use of *in vitro* biotinylated sdAbs with streptavidin beads, his₆-sdAbs with cobalt chelating beads, or direct covalent coupling of sdAb to epoxy beads (data not shown). As proof of concept, the target of phage-sdAb KE9 was identified as cytokeratin 19 (KRT19). KRT19 is a relevant antigen for breast cancer analysis and is already used for immunohistochemical analysis,⁴⁰ as a tumor marker for serum analysis,^{41,42}

and for circulating tumor cells detection.⁴³ This result suggests that the proposed approach is capable of leading to the discovery of new relevant cancer related targets and biomarkers.

The *in vivo* biotinylation approach was also used to generate a sensitive multiplexed cytometry bead array. This assay can be directly compared to the ELISA method,¹⁰ but requires smaller volumes of sample material, and can be multiplexed. Thus bead array represents the method of choice for low density antibody array for clinical use such as diagnosis or prognosis.^{11,12} SdAbs have a tendency to bind cryptic epitopes normally inaccessible to conventional antibodies.²⁵ The anti-HER2 sdAb and the anti-KRT19 sdAb selected in this work seem to follow the same trend since they do not compete with trastuzumab or a commercial anti-KRT19 mAb, respectively. This characteristic facilitates the design of sandwich assays once the antigen is identified. Because we used *in vivo* biotinylation leading to the addition of a single biotin at the C-terminus of sdAbs, we could use fluorescently coded streptavidin beads that were coupled to a single sdAb before being mixed and incubated with the sample. This approach bypasses the need to covalently bind each chosen sdAb to a batch of fluorescent beads, and allows the HT-compatible generation of multiplexed bead arrays.

A necessary step in metastasis is the dissemination of malignant cells into the bloodstream, where cancer cells travel throughout the body as CTC in search of an opportunity to seed a secondary tumor. CTC detection represents a valuable diagnostic tool and can be used as liquid biopsy for prognostic and predictive purposes. There has been a push toward developing technologies to reliably detect CTC using a variety of molecular and immunocytochemical techniques. One of the numerous problems of CTC purification is the heterogeneous nature of CTC, and the difficulty to define appropriate specific antigens for their detection. The availability of several sdAbs targeting new anti-tumor makers might be helpful. Here, as proof of this concept, we describe a sensitive and powerful enrichment procedure of rare tumor cells using an anti-HER2 sdAb. Importantly, this system is highly flexible and only relies on the availability of relevant anti-tumor sdAbs. The use of two different sdAbs for targeting two markers for the capture and the detection is an easy way to enhance the specificity of this assay. As the proposed approach to generate anti-tumor sdAbs is fully compatible with high throughput approaches, it becomes feasible to test various sdAb combinations to optimize this CTC assay.

Thus, the combination of phage display and single domain antibody technology appears to be an attractive approach to rapidly generate a variety of binders whose characteristics are especially well adapted to the generation of inexpensive but powerful diagnostic tools for breast cancer diagnosis.

Materials and methods

Proteins

sdAb CEA17 has been previously described.²⁵

Herceptin is a kind gift from Daniel Olive (CRCM, Marseille, France).

Plasmid pET-14b was used to produce enzymatically biotinylated sdAbs *in vivo*. All sdAbs produced in this vector carry a

C-terminal his₆-tag, preceded by the Avitag™ (GLNDIFEAQ-KIEWHE). For generation of plasmids coding for sdAb-avitag™M-his₆, see ref. 38.

To subclone sdAbs isolated by selection in the pHEN1-PhoA-6HisGS plasmid⁴⁴ in plasmids coding for sdAb-avitag™-his₆,³⁸ sdAb was first amplified from pHEN1-sdAb-myc-his₆ using primers pHENpETA_{virev} (CGTTCAGACCTGCGGCCGCT-GAGGAGACAGTGACCTGG) and pHENpETA_{vifor} (CTTTA-AGAAGGAGATATACCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTG). Vector pET-sdAbaNef-avitag-his₆ was digested with NcoI and NotI and purified. Cloning by recombination was performed using In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kits (clontech) as recommended by the manufacturer. All constructs were verified by nucleotide sequencing.

To subclone sdAbs isolated by selection (in pHEN1 plasmid) in plasmids coding for sdAb-Fc (Fc from human IgG1), sdAbs were first amplified from pHEN1-sdAb-myc-his₆ using primers 5HLsecVHH (GGTTGCGTAGCTGAAACCGGTGAGGTG-CAGCTGGTG) and 3VHHendH (CGGTGGCCATGTGT-GAGTTTTGTCTGAGGAGACGGTGACCTG). Vector pHLsec-sdAb-Fc was digested with AgeI and BstEII and purified. Cloning by recombination was performed using In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kits (clontech) as recommended by the manufacturer. All constructs were verified by nucleotide sequencing.

Serum sample, cells lines, biopsies

Patient sera were kindly provided by Prof. J. H. M. Cohen, (Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims). Concentration of soluble CEA in patient sera varied between 150 and 750 ng mL⁻¹ while CEA negative sera have a concentration of CEA lower than 5 ng mL⁻¹.

MC38 is a kind gift from A. Pelegrin (INSERM U896, IRCM, Montpellier, France), MCF7, SKBr3, SKOV3 and T47D are kind gifts from Daniel Olive. MDA-MB-231 and HCC1937 are kind gifts from Marie Alix Poul (Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, France). BrCa-Mz-01, HCC1806, HCC1954, and BT474 are kind gifts from Jean Imbert (INSERM, U928, TAGC, Marseille, France). Cell lines MC38, SKOV3, MDA-MB-231, MCF7, T47D, and HCC1937 were cultured in DMEM complemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Cell lines SKBr3, HCC1954, BrCaMz01, BT474, and HCC1806 were cultured in RPMI complemented with 10% (v/v) fetal calf serum. The HME1 cell line was purchased from ATCC and grown as recommended by the manufacturer. All cell lines were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere and with 5% CO₂. PBMCs were isolated by ficoll gradient from the blood of healthy donors.

Informed consent was obtained from each patient prior to biopsy. Breast cancer biopsy references: 5801, 5772e, 5766, 5586, 5572i, 5592, 5011, 5712, 5713, 5033, 5627.

Biopsies or cells were lysed with a potter in lysis buffer: 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris HCl pH8 with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche). The lysate was centrifuged for 10 min at 13000 g at 4 °C. The supernatant was the final cell lysate. Total protein concentration (average between

2–5 mg mL⁻¹) was determined spectrophotometrically using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Production, purification, and *in vitro* biotinylation of sdAbs

Production and purification procedures of *in vivo* biotinylated sdAbs were performed as described.³⁸

In vitro biotinylation of protein was performed using the Ez-link micro NHS-PEO4- biotinylation kit (Perbio science) following the recommendation of the manufacturer.

Llama immunization and library construction

Three young adult llamas (*Lama glama*) were immunized subcutaneously at days 1, 30, 60, 90, and 120 with breast cancer biopsy lysates (4701, 4952) or with healthy breast biopsy (one biopsy lysate per animal). One llama was immunized with 50 million SKOv3 cells which strongly express HER2. VHH library construction was performed as described.^{25,45} Briefly, genes coding for VHH were amplified by RT-PCR from the total RNA of peripheral blood mononuclear cells isolated by ficoll gradient, and cloned into phagemid pHEN1.

Selection of phage-sdAbs

A phage-sdAb library was produced as described in ref. 25 using the KM13 helper phage.

Different strategies of panning were applied. Phage selection was performed using antigen-coated magnetic epoxy beads (Dynabeads, Invitrogen, following recommendations of the manufacturer), using a 96-well maxisorp plate (Nunc) coated with antigen overnight at 4 °C, or using 2 × 10⁶ intact cells. Beads, plates, or cells were washed three times in PBS (using a magnetic particle concentrator for magnetic beads and a centrifugation step for cells). The phage-sdAb library (1 mL) and beads, cells, or plates were saturated in milk PBS 2%. For selection including a depletion step, phage-sdAb libraries were incubated with depletion support with rotation for 2 h at room temperature or at 4 °C for cells. Phage-sdAb libraries (depleted or not) were recovered and incubated with beads or plates with rotation for 2 h at room temperature or at 4 °C for cells. Next, beads, cells, or plates were washed ten times with 1 mL of PBS 0.1% Tween (without Tween for cells) and twice with PBS. Phages fixed on beads, cells, or plates were eluted with 1 mg mL⁻¹ trypsin solution (Sigma) for 30 min at room temperature with rotation. Eluted phages were treated as described in ref. 25.

ELISA assays

ELISA on epoxy beads. HER2-Fc or human Fc (R&D systems) were immobilized on magnetic epoxy beads (Dynabeads, Invitrogen) for 48 h at 4 °C following recommendations of the manufacturer. For ELISA, 2 µL of beads per well were used. Beads were blocked with 5% milk-PBS (MPBS) for two hours at RT. Beads were washed and incubated for 1 h at RT with 50 µL of 2% MPBS containing *in vivo* biotinylated sdAbs CEA17 or C7b at 10 µg mL⁻¹ or HRP-conjugated anti-Fc mAbs at 1 µg mL⁻¹. After three washes with PBS, beads with sdAbs were incubated with HRP-conjugated streptavidin (Jackson) (1 µg mL⁻¹) in 2% MPBS for one hour at RT. After three washes in PBS, bound antibodies were detected using ABTS. Coloration was followed at 405 nm.

Competitive ELISA on epoxy beads for affinity determination

A fixed concentration of *in vivo* biotinylated sdAb C7b (2 µg mL⁻¹) was added to serial dilutions of soluble HER2-Fc antigen (five-fold dilutions starting from 1.25 µM). After 1 h of incubation at RT, the remaining free fraction of biotinylated sdAb C7b was measured by incubating the mixture with 2 µL of HER2-Fc immobilized beads per well (prepared as above) for 30 min at RT. After washing, bound sdAbs were detected as described above. The dissociation constant was calculated using the non-linear curve fitting program Prism (GraphPad).

Phage-sdAb ELISA with lysate for screening and profiling.

Monoclonal phage-sdAbs were produced as described in ref. 25. Phage-containing supernatants were tested for binding by ELISA.

Fifty microliters per well of biopsy (5734, 5772ext, 5712, 5586, 5766, 5801, 5572int, 5592, 5627, 5011, 5033, 5713) or cell (BT474, SKBr3, HCC1954, MCF7, MDA-MB-231, T47D, HCC1806, BRCA-Mz-01, HCC1937, HME1, MC38, PBMC) lysates (200 µg mL⁻¹ of total proteins) were coated overnight at 4 °C on a maxisorp 96-well plate (Nunc). After three washes with PBS, plates were blocked with 5% MPBS for two hours at RT. Plates were incubated for 1 h at RT with 25 µL per well of phage-containing supernatants mixed with 25 µL per well of 4% MPBS. After three washes with PBS Tween 0.1% and three washes with PBS, plates were incubated with HRP-conjugated anti-M13 mAb (Pharmacia) diluted 1/5000 for 1 h at RT. After three washes with PBS Tween 0.1% and three washes with PBS, bound secondary antibodies were detected using ABTS. Coloration was followed at 405 nm.

ELISA using a couple of sdAbs. Streptavidin plates (Thermo scientific) were blocked with 5% milk-PBS (MPBS) for two hours at RT. Fifty microliters per well of *in vivo* biotinylated sdAbs at 10 µg mL⁻¹ in 2% MPBS were incubated overnight at 4 °C. Wells were washed and incubated for 1 h at RT with 50 µL of 2% MPBS containing cell (BT474, SKBr3, HCC1954, MCF7, MDA-MB-231, T47D, HCC1806, BRCA-Mz-01, HCC1937, HME1, MC38, PBMC) or biopsy (5734, 5772ext, 5712, 5586, 5766, 5801, 5572int, 5592, 5627, 5011, 5033, 5713) lysates at 100 µg mL⁻¹ of total proteins. After three washes with PBS Tween 0.1% and three washes with PBS, plates were incubated for 1 h at RT with 25 µL per well of phage-containing supernatants mixed with 25 µL per well of 4% MPBS. Following three washes with PBS Tween 0.1% and three washes with PBS plates were incubated with HRP-conjugated anti-M13 mAb diluted 1/5000 for 1 h at RT. After three washes with PBS Tween 0.1% and three washes with PBS, bound secondary antibodies were detected using ABTS. Coloration was followed at 405 nm.

Flow cytometry analysis

Experiments were performed on ice with rocking in 1% BSA PBS. Typically, 2 × 10⁵ cells resuspended in 50 µL were distributed in a 96-well microtiter plate, and incubated for 1 h with various concentrations of *in vitro* biotinylated antibodies. After washing, binders were detected with PE conjugated streptavidin (1 : 10) (Beckman Coulter). Fluorescence was measured using a MACSQuant (Miltenyi) analyzer and results

were analyzed with the MACSQuant software. Negative (secondary antibody only) controls were carried out.

Immunoprecipitation

Cell lysates were depleted by incubation with magnetic streptavidin beads (Dynabeads, Invitrogen) for 2 h at RT. At the same time, *in vivo* biotinylated sdAbs were incubated with magnetic streptavidin beads for 1 h at RT (4 µg of sdAbs for 100 µL of beads for one immunoprecipitation). Beads were washed 3 times with PBS and incubated with depleted cell lysates for 2 h at RT under agitation. Beads with immune complexes were washed 5 times with lysis buffer and heated to 95 °C for 5 min in 10 µL of non-reducing protein loading buffer.

In-gel digestion and MALDI-TOF MS

Protein spots excised from Coomassie blue (Imperial Protein stain, Pierce) stained gels were subjected to in-gel digestion with trypsin (sequencing grade modified porcine trypsin; Promega, Madison, WI, USA) according to a modified protocol of Shevchenko *et al.*⁴⁶ Tryptic peptides were then extracted from the gel, pooled, and dried in a Speedvac evaporator. Mass analyses were performed on a MALDI-TOF-TOF Bruker Ultraflex spectrometer (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) controlled by the Flexcontrol 3.0 package (Build 173.1). A list of contaminant ions was compiled from a blank sample (a blank piece of gel treated and analysed exactly as a true sample) and subtracted from sample peak lists before database search. The peptide mass lists were used to identify the protein using MASCOT software 2.2 (Matrix Science) available on site.

Immunochemical assay

In vivo biotinylated nanobodies were tested by immunostaining 5 µm sections of frozen-embedded cancer tissues. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with 3% H₂O₂. Slides were incubated for 1 h with 10 µg mL⁻¹ of *in vivo* biotinylated nanobodies at RT. Detection was performed by incubation at RT for 30 min with streptavidin peroxidase. Visualization was performed by DAB revelation (Dako) peroxidase reaction using haematoxylin as a counterstain.

CBA assay

Three types of CBA Functional Bead systems (BD Biosciences) were used for the assay.

The Functional Bead Conjugation Buffer Set was used for conjugation of streptavidin with beads following the recommendation of the manufacturer.

For the multiplexed assay, 1.5×10^5 beads of each type were used per assay. The whole procedure was performed in the dark. Beads were coated with sdAbs individually and all types of beads were mixed for the rest of the procedure. Beads were blocked with 3% BSA PBS for 2 h at RT. Beads were incubated with *in vivo* biotinylated sdAbs (C7b, CEA17, KE9) at 10 µg mL⁻¹ in 1% BSA PBS for 1 h at RT. After two washes with PBS, all bead types were mixed and incubated for 1 h at RT with serial dilutions of the sample containing patient serum with CEA, recombinant HER2-Fc (R & D systems), and a lysate of biopsy 5712. After two washes with

PBS, beads were incubated for 1 h at RT with 2 µg mL⁻¹ of anti-HER2 mAb (Santa-Cruz, sc-74241), anti-CK19 mAb (Santa-Cruz, sc-53258), and anti-CEA mAb 35A7 (kind gifts from A. Pelegrin, Montpellier). After two washes with PBS, beads were incubated for 1 h at RT with PE-conjugated goat anti-mouse mAb (Santa cruz) diluted 1/200. Fluorescence was measured using a MACSQuant (Miltenyi) analyzer and results were analyzed with the MACSQuant software. Negative controls (secondary antibody only) were carried out.

Rare cells enrichment assay

The enrichment procedure was performed using Streptavidin Microbeads (Miltenyi Biotec) following the recommendation of the manufacturer. The capture antibody was *in vitro* biotinylated sdAb C7b at 10 µg mL⁻¹. The detection antibody was Herceptin labeled with Alexa660 at 10 µg mL⁻¹. Labeling was performed using the Alexa Fluor[®] 660 Protein Labeling Kit (Molecular Probes, Invitrogen) following the recommendation of the manufacturer. We used a ratio of 3000 SKBr3 cells mixed with 6 000 000 human PBMCs.

Acknowledgements

This work was supported by the ANR (Agence Nationale de Recherche) program 'Nanosciences and Nanotechnologies' under the grant ANR-07-PNANO-051-01 and by the ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer). We would like to thank Matthieu Pophillat for excellent MS expertise.

References

- 1 M. T. Tirona, R. Sehgal and O. Ballester, *Cancer Invest.*, 2010, **28**, 743–750.
- 2 S. N. Histed, M. L. Lindenberg, E. Mena, B. Turkbey, P. L. Choyke and K. A. Kurdziel, *Nucl. Med. Commun.*, 2012, **33**, 349–361.
- 3 E. Seregni, A. Coli and N. Mazzucca, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2004, **31**(Suppl 1), S15–22.
- 4 R. A. Nunes and L. N. Harris, *Clin. Breast Cancer*, 2002, **3**, 125–135; discussion 136–127.
- 5 W. P. Carney, R. Neumann, A. Lipton, K. Leitzel, S. Ali and C. P. Price, *Clin. Breast Cancer*, 2004, **5**, 105–116.
- 6 M. van de Vijver, *Oncology*, 2002, **63**(Suppl 1), 33–38.
- 7 M. F. Lerwill, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2004, **28**, 1076–1091.
- 8 M. Sanchez-Carbayo, *Tumour Biol.*, 2010, **31**, 103–112.
- 9 E. Morgan, R. Varro, H. Sepulveda, J. A. Ember, J. Apgar, J. Wilson, L. Lowe, R. Chen, L. Shivraj, A. Agadir, R. Campos, D. Ernst and A. Gaur, *Clin. Immunol.*, 2004, **110**, 252–266.
- 10 M. F. Elshal and J. P. McCoy, *Methods*, 2006, **38**, 317–323.
- 11 J. M. Schwenk, M. Gry, R. Rimini, M. Uhlen and P. Nilsson, *J. Proteome Res.*, 2008, **7**, 3168–3179.
- 12 R. Rimini, J. M. Schwenk, M. Sundberg, R. Sjoberg, D. Klevebring, M. Gry, M. Uhlen and P. Nilsson, *J. Proteomics*, 2009, **73**, 252–266.
- 13 P. Paterlini-Brechot and N. L. Benali, *Cancer Lett. (Shannon, Irel.)*, 2007, **253**, 180–204.
- 14 E. S. Lianidou and A. Markou, *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)*, 2011, **57**, 1242–1255.
- 15 S. Dubel, O. Stoevesandt, M. J. Taussig and M. Hust, *Trends Biotechnol.*, 2010, **28**, 333–339.
- 16 T. Schirmann, L. Al-Halabi, S. Dubel and M. Hust, *Front. Biosci.*, 2008, **13**, 4576–4594.
- 17 A. Honegger, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2008, 47–68.
- 18 C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman and R. Hamers, *Nature*, 1993, **363**, 446–448.
- 19 L. Huang, S. Muyldermans and D. Saerens, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2010, **10**, 777–785.

- 20 I. Vaneycken, M. D'Huyvetter, S. Hernot, J. De Vos, C. Xavier, N. Devoogdt, V. Caveliers and T. Lahoutte, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, **22**, 877–881.
- 21 D. Gueorguieva, S. Li, N. Walsh, A. Mukerji, J. Tanha and S. Pandey, *FASEB J.*, 2006, **20**, 2636–2638.
- 22 S. Muyltermans, *J. Biotechnol.*, 2001, **74**, 277–302.
- 23 H. R. Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 1105–1116.
- 24 U. B. Nielsen and J. D. Marks, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2000, **3**, 282–291.
- 25 G. Behar, P. Chames, I. Teulon, A. Cornillon, F. Alshoukr, F. Roquet, M. Pugniere, J. L. Teillaud, A. Gruaz-Guyon, A. Pelegrin and D. Baty, *FEBS J.*, 2009, **276**, 3881–3893.
- 26 D. Kastelic, S. Frkovic-Grazio, D. Baty, G. Truan, R. Komel and D. Pompon, *J. Immunol. Methods*, 2009, **350**, 54–62.
- 27 X. Cai and A. Garen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**, 6537–6541.
- 28 R. C. Roovers, E. van der Linden, A. P. de Bruine, J. W. Arends and H. R. Hoogenboom, *Eur. J. Cancer*, 2001, **37**, 542–549.
- 29 J. B. Ridgway, E. Ng, J. A. Kern, J. Lee, J. Brush, A. Goddard and P. Carter, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 2718–2723.
- 30 C. Gao, S. Mao, F. Ronca, S. Zhuang, V. Quaranta, P. Wirsching and K. D. Janda, *J. Immunol. Methods*, 2003, **274**, 185–197.
- 31 C. A. Geuijen, N. Bijl, R. C. Smit, F. Cox, M. Throsby, T. J. Visser, M. A. Jongeneelen, A. B. Bakker, A. M. Kruisbeek, J. Goudsmit and J. de Kruif, *Eur. J. Cancer*, 2005, **41**, 178–187.
- 32 T. Heitner, A. Moor, J. L. Garrison, C. Marks, T. Hasan and J. D. Marks, *J. Immunol. Methods*, 2001, **248**, 17–30.
- 33 B. Liu, F. Conrad, M. R. Cooperberg, D. B. Kirpotin and J. D. Marks, *Cancer Res.*, 2004, **64**, 704–710.
- 34 C. Marks and J. D. Marks, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **335**, 730–733.
- 35 C. Mazuet, D. Lerouge, M. A. Poul and N. Blin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, **348**, 550–559.
- 36 Y. Yarden, *Oncology*, 2001, **61**(Suppl 2), 1–13.
- 37 C. A. Benedict, A. J. MacKrell and W. F. Anderson, *J. Immunol. Methods*, 1997, **201**, 223–231.
- 38 K. Even-Desrumeaux, D. Baty and P. Chames, *Mol. Biosyst.*, 2010, **6**, 2241–2248.
- 39 J. Bouchet, S. E. Basmaciogullari, P. Chrobak, B. Stolp, N. Bouchard, O. T. Fackler, P. Chames, P. Jolicœur, S. Benichou and D. Baty, *Blood*, 2011, **117**, 3559–3568.
- 40 B. A. Gusterson, D. T. Ross, V. J. Heath and T. Stein, *Breast Cancer Res.*, 2005, **7**, 143–148.
- 41 C. Alix-Panabieres, J. P. Vendrell, M. Slijper, O. Pelle, E. Barbotte, G. Mercier, W. Jacot, M. Fabbro and K. Pantel, *Breast Cancer Res.*, 2009, **11**, R39.
- 42 V. Barak, H. Goike, K. W. Panaretakis and R. Einarsson, *Clin. Biochem.*, 2004, **37**, 529–540.
- 43 L. Wang, Y. Wang, Y. Liu, M. Cheng, X. Wu and H. Wei, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2009, **28**, 57.
- 44 N. Alvarez-Rueda, M. Z. Ladjemi, G. Behar, S. Cognac, M. Pugniere, F. Roquet, C. Bascoul-Mollevi, D. Baty, A. Pelegrin and I. Navarro-Teulon, *Vaccine*, 2009, **27**, 4826–4833.
- 45 N. Alvarez-Rueda, G. Behar, V. Ferre, M. Pugniere, F. Roquet, L. Gastinel, C. Jacquot, J. Aubry, D. Baty, J. Barbet and S. Birkle, *Mol. Immunol.*, 2007, **44**, 1680–1690.
- 46 A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm and M. Mann, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 850–858.

3. Discussion et résultats complémentaires

Après l'isolement d'anticorps pertinents pour le diagnostic du cancer du sein, nous avons voulu démontrer que ceux-ci étaient facilement utilisables dans diverses applications diagnostiques telles que des tests ELISA, l'IHC, les puces à anticorps ou l'enrichissement de cellules rares.

Dans des applications en cytométrie de flux et immunohistochimie, les sdAbs se sont révélés spécifiques et sensibles. En ce qui concerne les tests ELISA, étonnamment, une immobilisation directe des lysats de cellules utilisées pour les sélections sur les plaques de 96 puits MaxiSorp a pu être utilisée pour caractériser la spécificité de liaison des clones sélectionnés contre un large éventail de lignées cellulaires et de biopsies lysats. La grande complexité de ces lysats et les possibles changements de conformation des antigènes en raison du processus d'adsorption auraient pu conduire à une très faible disponibilité de l'antigène d'intérêt. Or, nous avons constaté que la plupart des clones sélectionnés pouvaient lier leurs antigènes dans ces conditions. Ces phages liés ont été détectés en utilisant un mAb dirigé contre la protéine p8, présente à environ 2800 copies à la surface de chaque particule de phage, permettant ainsi une amplification considérable du signal. Les phages-ELISA sur lysats représentent donc une méthode de type « reverse phase array » sensible, robuste, peu coûteuse et compatible au haut débit qui peut être exploitée pour tester des centaines d'anticorps contre des dizaines de lysats. Cette approche pourrait donc être utilisée pour générer des profils antigéniques de différents échantillons de cancer.

Il a été aussi primordial de démontrer la possibilité d'identifier les antigènes reconnus par ces sdAbs. En effet, une étape majeure dans de nombreux aspects de la recherche est l'identification de biomarqueurs spécifiques et sensibles appropriés au développement de méthodes diagnostiques et pronostiques efficaces et de nouvelles modalités thérapeutiques. Aujourd'hui grâce aux méthodes protéomiques telles que la spectrométrie de masse ou les puces à ADN, ARN ou protéines, la liste des biomarqueurs tumoraux potentiels est en augmentation rapide. Malgré cette abondance, très peu de protéines ont trouvé leur chemin dans la phase de validation clinique et encore moins sont utilisées comme cibles thérapeutiques ou marqueurs diagnostiques fiables. La disponibilité des anticorps nous a permis de réaliser des immunoprécipitations pour purifier et identifier les antigènes correspondants par spectrométrie de masse. Pour un des anticorps isolé, l'antigène a pu être

immunoprécipité et identifié par spectrométrie de masse. Il s'agit d'un anticorps reconnaissant la cytokératine 19. Cette protéine, un marqueur des cellules épithéliales, est très utilisée en recherche pour la détection de cellules tumorales circulantes dans le cadre du diagnostic du cancer du sein métastatique. C'est également une protéine qui peut être retrouvée dans le sérum de patientes atteintes de métastases. Ces résultats démontrent que le système choisi est efficace et que les anticorps isolés semblent pertinents pour l'analyse et le diagnostic du cancer du sein.

Grâce à la méthode d'immobilisation des sdAbs biotinylés *in vivo* mise au point, nous avons réalisé une puce modèle en phase liquide sur CBA (*cytometric bead array*) pour l'analyse multiplexée, sensible et spécifique de trois antigènes bien connus et caractérisés présents dans un échantillon complexe, l'ACE, HER2 et la cytokératine 19, ainsi qu'un antigène inconnu, présent dans des lysats de biopsies. Les sdAbs ont tendance à reconnaître des épitopes différents des mAbs ce qui facilite la conception de dosages en sandwich une fois l'antigène identifié. Dans notre expérience sur sphères fluorescentes, chaque sdAb est immobilisé sur un type de sphère codée permettant ainsi d'identifier la nature de l'antigène analysé par la fluorescence de cette dernière. Ce système nous permet d'analyser plusieurs antigènes différents simultanément par analyse en cytométrie en flux.

Le dernier exemple d'application est une technique d'enrichissement de cellules rares. En effet les CTC correspondent à une infime minorité des éléments figurés du sang, et ont probablement une concentration inférieure à 0,1 cellule par mm^3 , soit moins d'une cellule pour 100.000 cellules mononuclées sanguines (CMNS). Leur détection doit donc faire appel à des techniques hautement sensibles et est souvent précédée d'une étape d'enrichissement. Nous avons montré la possibilité d'utiliser nos anticorps pour réaliser des expériences d'enrichissement efficaces et spécifiques grâce au système de colonne d'enrichissement commercialisé par Miltenyi. Nous avons pu montrer un très fort enrichissement (d'un facteur 276) en utilisant le sdAb C7b anti-HER2 (présenté dans la publication), mais nous avons aussi pu démontrer l'enrichissement de cellules rares grâce à des sdAbs isolés sur cellules entières par sélection masquée (Fig. 32). En effet, grâce au sdAb M.D5 pour la capture des cellules rares, nous arrivons à un enrichissement d'un facteur 326 par rapport au ratio initial. La spécificité de l'anticorps isolé est encore démontrée ici, puis qu'il ne reste que 13 000 CMNS sur les 6 millions ajoutés au départ alors que nous récupérons plus de 2900 cellules HER2+, sur les 3000 mises au départ (Fig. 32).

Capture sdAb	Total cells	Total cells (% recovery)	HER2+ cells	HER2+ cells (% recovery)	HER2+ cells (% final)	Enrichment
aHER2C7b	18650	0.31	2938	97.9	16.56	276
M.D5	16232	0.27	2979	99.3	19.58	326

Figure 32 : L'enrichissement des cellules rares. L'enrichissement du mélange initial de cellules SKBR3 (3000) dans les CMNS humains (6 000 000) avec donc un rapport initial de 0,6% de cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses ont été enrichies par capture sur des microbilles recouvertes de streptavidine par l'intermédiaire de différents sdAbs (aHER2C7b, M.D5) biotinylés *in vitro*. La détection des cellules SKBr3 a été réalisée par l'Herceptine marquée avec Alexa660. La procédure d'enrichissement a été réalisée sur le MACSQuant avec le programme "enrichment" et analysée par cytométrie en flux sur le MACSQuant.

Les mises au point des différents tests présentés ont été très rapides et les anticorps ont rempli toutes leurs promesses en termes de possibilité d'application simple, rapide et applicable haut débit. Les avantages de nos sdAbs en termes de production, stabilité, spécificité et sensibilité ont répondu à toutes nos attentes. Un avantage majeur de l'utilisation de nos anticorps pour de telles applications est la flexibilité des systèmes obtenus. En effet, grâce à l'utilisation systématique de la biotinylation *in vivo* des sdAbs, nous pouvons les utiliser dans de nombreuses applications de façon très simple et flexible en utilisant la streptavidine comme agent de capture ou de détection. En effet, prenons l'exemple de nos puces à anticorps. Dans le cadre des puces en phase liquide commerciales (les technologies Luminex ou CBA, utilisées pour le dosage de cytokines principalement), chaque sphère est vendue couplée à un mAb spécifique et non interchangeable. L'utilisateur est donc dans l'incapacité d'analyser une nouvelle cible qui ne serait pas incluse dans le kit. Dans notre cas, les sphères fluorescentes CBA sont toutes fonctionnalisées avec de la streptavidine. Ensuite, les sdAbs biotinylés *in vivo* sont immobilisés de façon forte et orientée sur cette surface. Il est donc possible grâce à ce système de bénéficier d'une flexibilité totale. Pour chaque expérience, il suffit d'immobiliser les sdAbs reconnaissant les cibles voulant être dosées ce jour là, et de réaliser le test. A chaque expérience, les cibles dosées peuvent être différentes en

fonction des besoins. L'argument reste valide concernant l'enrichissement de cellules rares. En effet, la capture des CTC est faite par un sdAb biotinylé *in vitro* couplé à des billes de streptavidine. La flexibilité du système est donc encore totale, et permettrait une meilleure approche pour cette application qui demande une très grande spécificité. En effet, le cancer du sein étant une maladie extrêmement hétérogène, la recherche de CTC peut nécessiter d'utiliser des antigènes très variables en fonction des patientes. Grâce à la flexibilité de notre système, un diagnostic et un suivi personnalisé au cas par cas en fonction des caractéristiques moléculaires du cancer de la patiente seraient donc envisageables.

Une dernière application que nous avons tenu à démontrer est la possibilité d'utiliser les sdAbs comme anticorps intracellulaires ou intrabodies. Pour démontrer la fonctionnalité de nos sdAbs en milieu intracellulaire, nous les avons clonés dans un vecteur d'expression eucaryote (pCDNA) en fusion avec une protéine fluorescente, mRFP1. Après transfection des cellules MCF7 avec 3 de nos anticorps (le KE9 anti cytokératine 19, ainsi que le KE36 et KE21, de cible inconnue), nous avons observé la répartition cellulaire de nos sdAbs en suivant par microscopie en fluorescence la localisation de la protéine mRFP1. Nous pouvons observer que lorsque la protéine mRFP1 est produite seule dans les cellules, elle se localise principalement dans ou autour du noyau ainsi que dans le cytoplasme. Lorsque nos anticorps sont fusionnés à mRFP1, la localisation de cette dernière est totalement différente (Fig. 33). En effet, nous pouvons voir que l'anticorps KE9 entraîne une localisation principalement cytoplasmique de la fusion sdAb-mRFP1, le sdAb KE36 exclut totalement la fusion du noyau et au contraire, KE21 intègre entièrement la fusion dans le noyau. Nous constatons donc ici que nos sdAbs permettent une relocalisation de mRFP1, ce qui implique que nos sdAbs sont produits de façon fonctionnelle car ils se fixent à leur cible présente dans la cellule. L'utilisation des sdAbs comme intrabodies ouvre de nombreuses perspectives pour des approches thérapeutiques de ciblage de protéines intracellulaires telles que les protéines du télosome dans les cellules tumorales ou des protéines intracellulaires du VIH (*Virus de l'Immunodéficience Humaine*) comme les intégrases ou les répliquases chez des patients atteints de SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise).

MCF7 cells

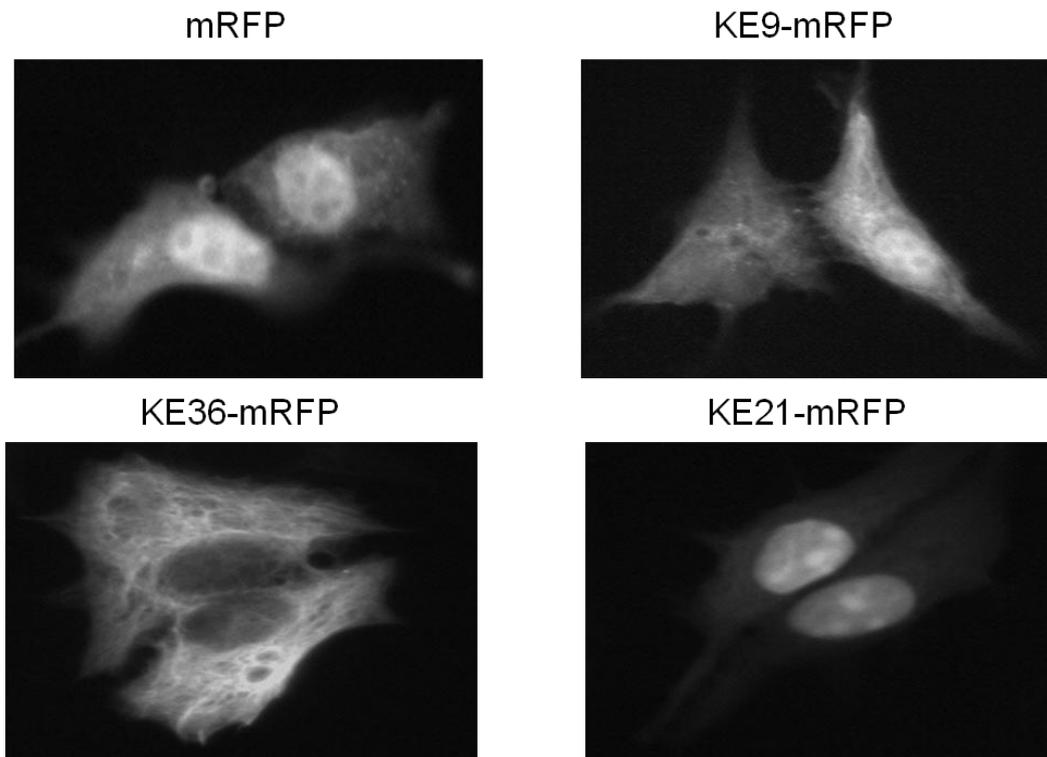


Figure 33 : Utilisation des sdAb comme intrabodies. Les cellules MCF7 sont transfectées avec le vecteur d'expression pCDNA-sdAb-mRFP1. La localisation des protéines de fusion sdAb-mRFP1 est analysée par microscopie en fluorescence.

Partie IV :

L'utilisation des sdAbs comme nano marqueurs

1. Introduction : L'association sdAbs et QDots comme outil diagnostique

L'imagerie est un outil diagnostique majeur qui délivre des images des parties internes du corps permettant aux médecins de constater la présence ou non d'une tumeur. Il s'agit aussi d'un instrument capital qui détermine l'état d'avancement du cancer, sa localisation exacte et qui précise la zone d'intervention chirurgicale.

L'interaction d'une molécule avec son environnement peut être appréhendée, à condition de pouvoir aisément l'identifier et la repérer au moyen de sondes adéquates. Les nanotechnologies consistent en la création et l'utilisation de matériaux et systèmes à l'échelle nanométrique (entre le nanomètre et la centaine de nanomètres), c'est-à-dire au niveau des molécules et complexes moléculaires. Les Quantum Dots (QDots) sont des particules cristallines de semi-conducteur ou de métal, de forme sphérique et de dimension nanométrique, le diamètre pouvant varier de 1 à 10 nm. Un QDot est constitué d'un noyau inorganique d'un matériau semi-conducteur (coeur) et d'un revêtement extérieur de molécules organiques (ligand tri-*n*-octylphosphine).

Une fonctionnalisation est nécessaire pour que ces sondes fluorescentes interagissent sélectivement avec une cible cellulaire donnée. Les stratégies de conjugaison avec les biomolécules comme les anticorps exigent que les biomolécules soient liées aux QDs sans altérer leur activité et/ou leur reconnaissance par certaines cibles cellulaires. Il existe deux grands procédés d'ancrage de biomolécules à la surface de QDs. Les QDs peuvent être conjugués à des biomolécules chargées via des stratégies non covalentes impliquant des interactions électrostatiques. Alternativement, l'ancrage des biomolécules peut être réalisé grâce à des liaisons covalentes et est le plus souvent basé sur la réaction entre une fonction amine de la biomolécule et un acide carboxylique (ou carboxylate) appartenant au ligand du QD. Une autre stratégie est l'utilisation de biomolécules soufrées ou modifiées à leur extrémité par une fonction thiol permettant le couplage par la formation d'une liaison disulfure entre la biomolécule soufrée et le thiol présent à la surface du QD.

L'intérêt majeur des QDs réside dans leur grande adaptabilité à de nombreuses applications biologiques. Les QDs ont des propriétés optiques hors du commun qui offrent de nombreux avantages comparés aux fluorophores organiques (Rhodamine, Fluorescéine, Alexa Fluor, etc...) pour l'imagerie de fluorescence. On peut notamment citer leur large spectre d'absorption dans l'UV et le visible et un spectre d'émission étroit et symétrique, la possibilité de multiplexage en visualisant simultanément plusieurs QDs émettant à des longueurs d'onde différentes via une excitation unique, une excellente photostabilité, de bons rendements quantiques de fluorescence (jusqu'à 85 %), une durée de vie de fluorescence très grande (typiquement de l'ordre de plusieurs dizaines de nanosecondes) qui permet de différencier les QDs de l'autofluorescence des cellules.

Une des approches les plus utilisées en diagnostic et imagerie est l'association de molécules fluorescentes avec des anticorps monoclonaux pour le ciblage spécifique de ces dernières. Mais les mAbs présentent certaines limitations. Tout d'abord, en raison de leur grande taille, ils permettent une pénétration très limitée des tissus. De plus la conjugaison des anticorps aux QDots est le plus souvent non orientée et provoque très fréquemment la dénaturation des anticorps (Pinaud, Michalet et al. 2006). De ce fait, l'utilisation d'anticorps plus petits permettant une orientation efficace de ces derniers à la surface des QDots permettrait une alternative intéressante pour l'élaboration de nanomatériaux utilisables en imagerie. Comme nous avons pu le voir au cours de l'introduction, les sdAbs sont des outils efficaces dans de nombreuses applications aussi diverses que variées. Ceci est encore vérifié dans ce cas où nous montrons le développement d'une nouvelle génération de nano-sondes très petites, grâce au couplage stable et orienté de sdAb à la surface des QDs via une extracystéine C-terminale. En utilisant comme antigène cible modèle l'ACE, nous démontrons ici diverses applications réalisables avec ces nano sondes telles que la cytométrie en flux et l'immunohistochimie.

2. Article 4

*Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots:
toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe*



ELSEVIER

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
xx (2011) xxx–xxx



Original Article

nanomedjournal.com

Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobes

Alyona Sukhanova, MD, PhD^a, Klervi Even-Desrumeaux, MSc^b,
Aymric Kisserli, PhD^a, Thierry Tabary, MD, PhD^a, Brigitte Reveil, BSc^a,
Jean-Marc Millot, PhD^a, Patrick Chames, PhD^b, Daniel Baty, PhD^b,
Mikhail Artemyev, PhD^c, Vladimir Oleinikov, PhD^d, Michel Pluot, MD^a,
Jacques H.M. Cohen, MD, PhD^a, Igor Nabiev, PhD^{a,*}

^aEA3798 Détection et Approches Thérapeutiques Nanotechnologiques dans les Mécanismes Biologiques de Défense, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

^bINSERM U624, Marseille, France

^cInstitute of Physico-Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, Belarus

^dShemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Received 10 May 2011; accepted 16 July 2011

Abstract

Common strategy for diagnostics with quantum dots (QDs) utilizes the specificity of monoclonal antibodies (mAbs) for targeting. However QD-mAbs conjugates are not always well-suited for this purpose because of their large size. Here, we engineered ultrasmall nanoprobes through oriented conjugation of QDs with 13-kDa single-domain antibodies (sdAbs) derived from llama IgG. Monomeric sdAbs are 12 times smaller than mAbs and demonstrate excellent capacity for refolding. sdAbs were tagged with QDs through an additional cysteine residue integrated within the C terminal of the sdAb. This approach allowed us to develop sdAbs-QD nanoprobes comprising four copies of sdAbs coupled with a QD in a highly oriented manner. sdAbs-QD conjugates specific to carcinoembryonic antigen (CEA) demonstrated excellent specificity of flow cytometry quantitative discrimination of CEA-positive and CEA-negative tumor cells. Moreover, the immunohistochemical labeling of biopsy samples was found to be comparable or even superior to the quality obtained with gold standard protocols of anatomopathology practice. sdAbs-QD-oriented conjugates as developed represent a new generation of ultrasmall diagnostic probes for applications in high-throughput diagnostic platforms.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Diagnostic nanoprobes; Quantum dots; Single-domain antibody; Flow cytometry; Immunohistochemistry

The common approach to biodetection and diagnostics with quantum dots (QDs) is to use the specificity and avidity of monoclonal antibodies (mAbs) for QD targeting.^{1,2} Although several mAbs-QD conjugates have been used for biomarkers labeling, they are large, which limits the number of ligands that

can be linked to the surface of a QD, impedes intratumoral distribution due to interstitial tumor pressure, and limits their intracellular and intratissue penetration. Conventional immunoglobulins G (IgG) have a molecular weight of 150 kDa with an average size of $14.5 \times 8.5 \times 4 \text{ nm}^3$ and thus are not well-suited for the targeting purpose.³ Furthermore, the conditions used for mAbs conjugation often provoke IgG unfolding⁴ and provide nanoprobes with irregular orientation of mAbs on the surface of QDs. Smaller antibody (Ab) fragments conjugated with the QDs in a highly oriented manner can be considered as an attractive alternative for generation of ultrasmall targeted nanoprobes.

IgG is composed of two identical light chains and two identical heavy chains (Figure 1, A). The light chain contains one variable (V_L) domain and one constant domain (C_L), and the heavy chain has one variable (V_H) and three constant domains (C_{Hs}). The antigen-binding sites of IgG are constituted by the

This work was supported by EU FP7-program through NMP-2009-4.0-3-246479 project NAMDIATREAM, by the French National Research Agency under the grants ANR-07-PNANO-051, ANR-08-BLAN-0185-01 and by Ligue Contre le Cancer, France; NATO Science for Peace Program SFP-983207 Advanced Biochips; Russian Foundation for Basic Research, grant 10-04-00393, Ministry of Education and Science of Russian Federation (V.O.) and Belarusian program Chemreagents (M.A.).

*Corresponding author: Department EA3798, "Détection et Approches Thérapeutiques Nanotechnologiques dans les Mécanismes Biologiques de Défense," Université de Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France.

E-mail address: igor.nabiev@gmail.com (I. Nabiev).

1549-9634/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.nano.2011.07.007

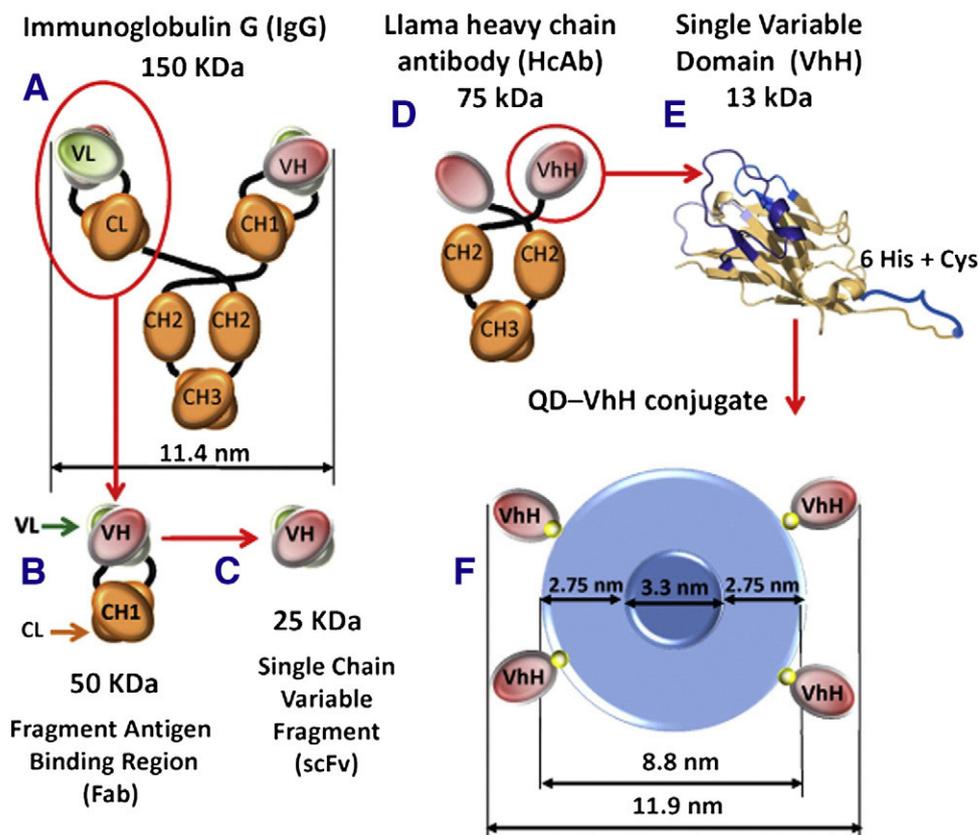


Figure 1. “Anatomy” of conventional antibody showing the names of IgG functional fragments and domains (A–C), a llama heavy-chain antibody (HcAb) (D), and a cartoon representation of a smallest functional llama antibody fragment–single-domain antibody (sdAb or VhH) (E). All objects are given to scale. sdAbs were C-terminally fused to a his6 tag for detection and purification purposes, and an additional and single C-terminal free cysteine residue (blue) was introduced for specific site-directed and oriented conjugation of sdAbs with the QD in panel E. sdAb antigen-binding loops are depicted in blue; the sdAb structure was adapted from PDB structure 1JTT. (F) An ultrasmall nanoprobe engineered from the CdSe-ZnS QD and sdAbs via sdAbs-oriented conjugation through His-Cys linker.

association of variable domains V_L - V_H (Figure 1, A). Functionally active Ab fragments called “fragment antigen binding fragment” (Fab; Figure 1, B) and “single-chain variable fragment” (scFv; Figure 1, C) have molecular masses of 50 and 25 kDa, respectively. Indeed, to improve the number of functional Abs on the QD surface, the integrity of the Ab-binding site and a suitable orientation of Abs after conjugation are two crucial parameters. Commercial Ab-QD probes are made by conjugation of the fragments of fully reduced Abs with amino groups at the surface of QDs.^{4,5} Complete reduction of Abs disrupts the integrity of the recognition locus comprising heavy and light chains that are linked by disulfide bonds and are separated after complete reduction of these bonds. Recently, we have developed an advanced conjugation procedure reducing the disulfide bonds between heavy chains but preserving integrity of the disulfide bonds between heavy and light chain.⁶ This allowed high-yield production of functional half-antibodies that were purified and tagged with QDs through reduced sulfhydryl (SH) groups, providing a nanoprobe with an intact recognition locus and homogeneous orientations of Abs relative to the QD surface. These probes showed a 10-fold improvement of nanoprobe recognition capacity.⁶

A scFv, consisting of IgG heavy- and light-chain variable domains connected with a flexible peptide linker (Figure 1, C), maintains a high binding affinity and specificity and, to the best of our knowledge, is the smallest Ab fragment that was used for preparation of nanoprobe shown to be efficient in specific *in vivo* and *in situ* tumor targeting and imaging.⁷ Unfortunately, the physicochemical properties of Fab and scFv, including their stability, tendency to aggregation, and production cost, do not qualify them as good candidates for routine preparation and application as targeting reagents.^{8,9} Additionally, the disadvantage of using Ab fragments such as Fab or scFv is that they reduce antibody avidity. A strategy to overcome this problem may include engineering of even smaller functional Ab fragments and delivering many of such fragments through a common carrier (e.g., QDs). Multivalent nanoprobe can even be engineered wherein the smallest functionally active fragments of different Abs specific for different antigens may be tagged with the same nanoparticle. This way more than one cellular target can be identified by a single multivalent Ab-fragment conjugate.¹⁰

With a molecular weight of only 13 kDa, single-domain antibodies (sdAbs or VhH, Figure 1, E) represent the smallest

functional Ab fragments capable of binding their antigens with affinities comparable to conventional antibodies.¹¹ A sdAb occupies only 1/12th of the volume filled by a conventional IgG antibody molecule, and its size allows it to bind epitopes inaccessible to conventional IgGs. In addition to their small size, sdAbs are characterized by a low tendency to aggregate; they exist as monomers, diffuse much better in tissues than full-size IgGs,¹² and their size should allow them to decorate thinner and more distal segments and to cover the antigens more delicately than is possible with conventional IgG. sdAbs are resistant to chemical detergents, extreme pHs, heat denaturation, and proteolysis,^{13,14} and can be produced inexpensively in *Escherichia coli* bacteria or in yeast. All these advantages make sdAbs the best capture molecules to prepare QD-based fluorescent nanoprobe for biodetection and diagnostics. In the recent article of Zaman et al,¹⁵ the authors used carbodiimide chemistry to conjugate epidermal growth factor receptor-specific sdAbs to QDs in an irregular, nonoriented manner. The resulting conjugates performed no better than conventional mAb-QD conjugates.

In this article we report on development of a new generation of ultrasmall, stable, and specific nanoprobe using highly oriented conjugation of sdAbs and QDs (Figure 1, F) and apply developed nanoprobe in flow cytometry and immunohistochemistry cancer-diagnostic platforms. As a proof of the concept, we chose to target carcinoembryonic antigen (CEA), a well-known cancer biomarker.¹⁶ Elevated concentration of CEA can be detected in the blood of some people bearing certain kinds of cancers, especially large intestine (colon and rectal) cancer. It may also be detected in people suffering from cancer of the pancreas, breast, ovary, or lung. CEA is normally produced during the development of a fetus.¹⁶ The production of CEA stops before birth and it usually is not present in the blood of healthy adults. The CEA test is used to find the extent of cancer spread for some types of the disease, especially colon cancer, and to monitor the treatment of colon cancer. CEA levels may be measured before and after surgery to evaluate not only the success of the surgery but also the person's chances of recovery, the efficiency of the treatment during therapy, or a recurrence of the disease.¹⁶ As a membrane antigen overexpressed by cancer cells, CEA can also be targeted for imaging or therapeutic approaches.

Methods

Cloning

CEA-specific sdAb C17 was selected from an immunized sdAb library as described by Behar et al¹⁷ sdAb C17 was first subcloned into pET vector, allowing its cytoplasmic production fused to a hexahistidine tag under control of the T7 promoter in BL21-DE3 strain, yielding plasmid pET sdAb-C17-his6. An extra C-terminal cysteine amino acid residue was engineered by mutagenesis using primers 6hisCys forward (CCATCATCATCACGGATCCTGCTAAGCTTGCTGAGCAATAACTAGC) and 6hisCys reverse (GCTAGTTATTGCTCAGCAAGCTTAGCAGGATCCGTGATGATGATGG), yielding pET sdAb-C17-his₆Cys. This specific integration of a single Cys residue within

the C terminus of the sdAb amino acid sequence was done to facilitate sdAb orientational conjugation with the QD through this single exposed SH-containing amino acid available for conjugation through sulfo-SMCC or PMPI conjugation reactions (see below).

Each reaction mixture (25 μ L) contained 50 ng of vector, 1 \times polymerase chain reaction buffer, 200 μ M dNTPs, 150 ng of each (sense and antisense) primer, and 1.25 U of Pfu Ultra DNA polymerase (Stratagene, Massy, France). The mixtures were heated at 95°C for 30 seconds, followed by 25 cycles consisting of denaturation at 95°C (30 seconds), annealing at 55°C (1 minute), and elongation at 68°C (2 minutes per kilobase of new construct). Once complete, 9 μ L of the reaction were treated with 1 μ L DpnI for 2 hours at 37°C to digest the methylated parental plasmid. DNA purification was performed by precipitation with absolute ethanol and washing with 70% ethanol. The reaction mixture was then transformed into electrocompetent XL1-blue cells. Positive clones were confirmed by DNA sequencing.

Production and purification of sdAbs

pET sdAb-C17-his₆Cys plasmid was transformed into BL21DE3 strain. Cells containing the plasmid were inoculated in 10 mL of 2YT medium (bactotryptone 16 g/L, yeast extract 10 g/L, NaCl 85 mmol), supplemented with ampicillin 100 μ g/mL and glucose 2%. Cells were grown overnight at 37°C (with shaking at 250 rpm) and diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in 400 mL of fresh 2YT medium supplemented with ampicillin (100 μ g/mL). Cell cultures were grown until the OD₆₀₀ reached 0.5. sdAbs expression was induced by the addition of 0.1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, and cells were incubated at 30°C with shaking at 250 rpm for 20 hours. The cell pellet was frozen during 20 minutes at -80°C and lysed by 20 mL of bugbuster (Novagen, Martillac, France) during 20 minutes with gentle shaking. Purifications with Talon metal affinity resin (Clontech, Saint Germain-en-Laye, France) were performed according to manufacturer protocols. Proteins were concentrated in phosphate buffered saline (PBS, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) by ultrafiltration with Amicon Ultra 5000 MWCO (Millipore, Billerica, Massachusetts) and stored at -20°C. Degree of purity of prepared sdAbs was evaluated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and protein concentration (nearly 5 mg/mL) was determined spectrophotometrically using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

Conjugation of sdAbs-SH antibodies with amino-modified QDs using Sulfo-SMCC reaction

Sulfo-SMCC, sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate water-soluble heterobifunctional cross-linker (Thermo Fisher Scientific p/a Perbio Science France SAS, Brebières, France), was used for preparation of sdAbs-QD conjugate. Water-soluble QDs containing 10% of amino-polyethylene glycol (amino-PEG) and 90% of hydroxyl-PEG on their surface were diluted to obtain 0.5 mL of 4 mg/mL QDs solution in 100 mmol phosphate buffer, pH 7.2. Then, a 100-fold molar excess of Sulfo-SMCC was added to the QDs preparation. The reaction mixture was incubated 1 hour at room temperature (20–23°C) in the dark with a mild agitation (40 rpm on the

RM-2L Intelli-Mixer, Dominique Dutscher SAS, Brumath, France). The maleimide-activated QDs were immediately purified by applying the reaction mixture to a home-made column packed with Sephadex G-25 resin (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri) equilibrated with 100 mM phosphate buffer, pH 7.2. To perform the conjugation reaction, the maleimide-activated QDs were mixed with sdAbs to obtain molar ratios of 1:10. The reaction mixture was incubated 2 hours at room temperature in the dark with mild agitation (40 rpm on the RM-2L Intelli-Mixer). Finally, the sdAbs-QD conjugates were purified by gel-exclusion chromatography on a home-made Superdex 200 resin (Sigma-Aldrich) column equilibrated with 100 mM phosphate buffer, pH 7.2. The content of sdAbs within the sdAbs-QD conjugates was determined spectrophotometrically using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories), and the QDs content was determined using the QDs extinction coefficient for the first exciton band of QDs absorption spectrum. The maximum sdAbs/QD molar ratio in prepared conjugates was found to be around four sdAbs per one QD.

Conjugation of sdAbs-SH antibodies with hydroxy-modified QDs using PMPI reaction

PMPI, *N*-(*p*-maleimidophenyl) isocyanate crosslinker (Pierce) was used to conjugate sdAbs-SH with hydroxyl-modified QDs using the protocol adapted from Annunziato et al.¹⁸ Water-soluble QDs having hydroxyl groups on their surface were diluted to obtain 0.5 mL of 2 mg/mL QDs solution in 50 mM sodium borate buffer, pH 8.5. Then, a 50-fold molar excess of PMPI was added to the sample. The reaction mixture was incubated 30 minutes at room temperature in the dark with mild agitation (40 rpm on the RM-2L Intelli-Mixer). The maleimide-activated QDs sample was immediately purified by applying the reaction mixture to the home-made column packed with Sephadex G-25 resin (Sigma-Aldrich) and equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. The purified maleimide-activated QDs sample was mixed with sdAbs to obtain molar ratios of 1:10.

The reaction mixture was incubated 2 hours at room temperature in the dark with mild agitation (40 rpm on the RM-2L Intelli-Mixer). Finally the sdAbs-QD conjugate was purified by gel-exclusion chromatography on a home-made Superdex 200 resin (Sigma-Aldrich) column equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. The contents of sdAbs and QDs within the sdAbs-QD conjugate were determined spectrophotometrically using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) and using the QDs extinction coefficient for the first exciton band of QDs absorption spectrum, respectively. The maximum sdAbs/QD molar ratio in prepared conjugates was found to be around four sdAbs per one QD.

Cell cultures

MC38 cells¹⁹ were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium glutaMAX media (Invitrogen-Gibco, Grand Island, New York) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (BioWhittaker, Lonza, Verviers, Belgium), penicillin, streptomycin, fungizone (1000 U/mL ; 1000 µg/mL ; 2.5 µg/mL). MC38CEA cells were cultured at the same conditions

and in the same medium with additional inclusion of G418 (Sigma-Aldrich).

sdAbs-QD conjugates were diluted in PBS (BioMérieux) containing 1% BSA (bovine albumin fraction V solution 7.5%; Invitrogen-Gibco), or in human serum from a pool of nontransfused AB male donors (Institute Jacques Boy, Reims, France) inactivated at 56°C during 30 minutes.

Labeling of cells with sdAbs-QD conjugates and flow cytometry measurements

MC38 and MC38CEA cells were suspended by gentle shaking for 5 minutes. A total of 300,000 washed cells were incubated for 30 minutes at 4°C in the dark with 50 µL of different dilutions of sdAbs-QD conjugates in potassium buffered saline buffer or human serum and washed two times with potassium buffered saline containing 1% BSA. Flow cytometry measurements of stained cells were performed immediately after staining with a FACStar^{Plus} apparatus (Becton Dickinson, Mountain View, California) or with a Guava^R EasyCyte Plus (Guava Technologies, Billerica, Massachusetts) flow cytometer. At least 5000 events for each sample were collected. A 488-nm argon laser was used for excitation, and fluorescence intensity was measured between 564 and 586 nm with FACStar^{Plus} (Becton Dickinson) and between 570 and 596 nm with Guava^R EasyCyte Plus flow cytometers (Guava Technologies). Median fluorescence (MF) intensity channels were used to quantify the staining of each sample.

Immunohistochemistry and fluorescence immunostaining

Human appendix tissue samples from retrospective incision biopsy specimens were obtained from the Department of Pathology of University Hospital Robert Debré (Reims, France). All experiments were performed with 5-µm-thick sections corresponding to retrospective specimens embedded in paraffin; results of the work did not influence any therapeutic treatment indeed, and the use of such samples does not require approval by the institution's human subject review committee.

Immunostaining was performed on 5-µm-thick paraffin sections. Sections were de-paraffinized in xylene, rehydrated through ethanol (100, 96, and 70%), and finally placed in water. The slides were left for 60 minutes in a citrate buffer (2% citric acid; 8% sodium citrate) in an incubator at 95°C followed by 20 minutes' incubation at room temperature in citrate buffer. The slides were incubated with 3% hydrogen peroxide and 20% methanol, to quench the endogenous peroxidases, and washed in water. Nonspecific binding was blocked by incubating the sections for 2 hours in 2% BSA in PBS with 0.5% Tween.

For tissue labeling with the conjugates of QD-sdAbs, the slides were stained with a 1.5×10^{-8} M solution of CEA-specific sdAbs-QD570 conjugates for 1 hour in a humidified chamber at room temperature. The slides were washed three times with PBS, and fluorescence emission was observed under a fluorescence microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) using 350–400 nm ultraviolet (UV) excitation and 450-nm long-pass emission filter.

In the experiments with the tissue labeling with the (organic dye)–Abs conjugates, appropriate dilutions of primary antibodies

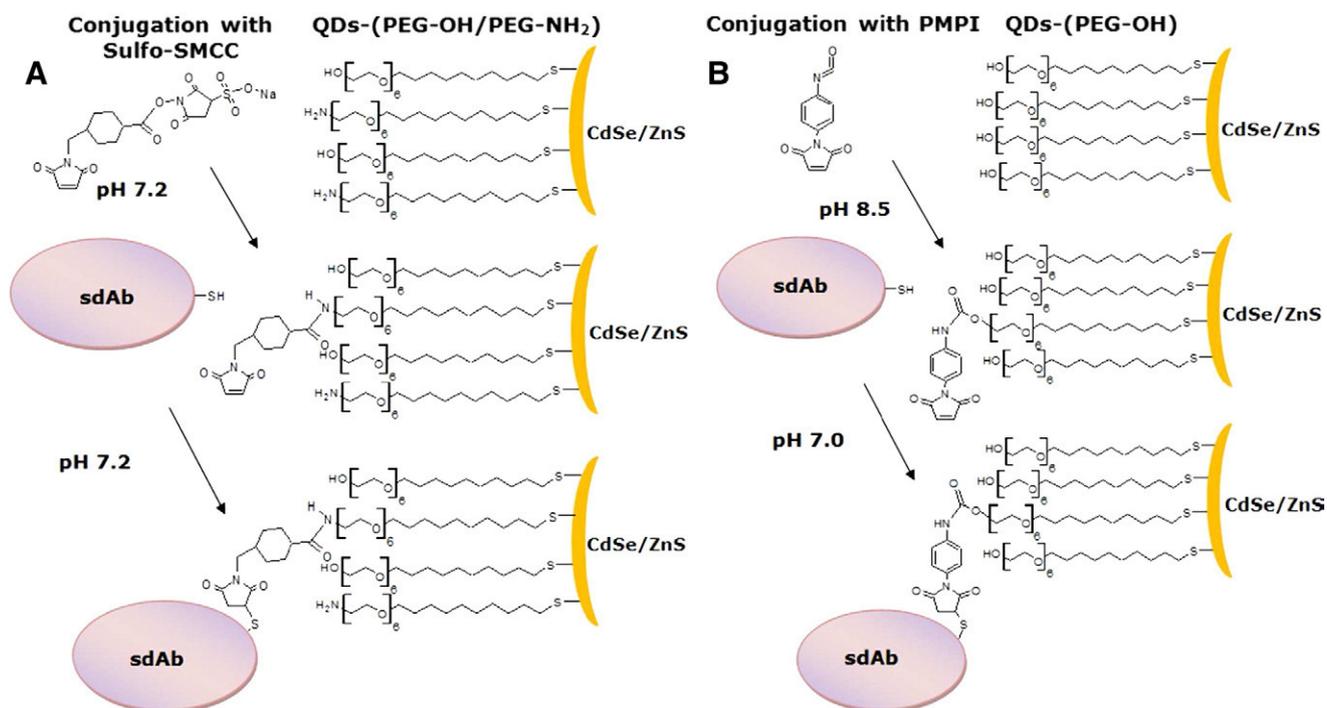


Figure 2. Schemes of PMPI- or sulfo-SMCC–based conjugation reactions for production of oriented sdAbs-QD conjugates by coupling of OH or NH₂ groups on the surface of QD with the SH group of the single Cys residue specifically integrated in the C terminal of sdAb and made available for conjugation. Procedures produce conjugates with around four copies of homogeneously oriented sdAbs per each QD.

(1.6×10^{-9} M solution of CEA-specific mAb, clone TF3H8 from Ventana Medical Systems, Illkirch-Graffenstaden, France) were applied to the tissue sections for 1 hour in a humidified chamber at room temperature. The slides were washed three times with PBS and incubated for 1 hour at room temperature with polyclonal goat anti-mouse IgGs conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; Dako, Glostrup, Denmark). After washing three times with PBS, the slides were observed under a fluorescence microscope (Carl Zeiss) using a 420–490 nm excitation and a 520-nm long-pass emission filter.

In control experiments corresponding to the “gold standard” immunohistochemical labeling of tissue sections with diaminobenzidine (DAB), the slides were incubated with CEA-specific mAbs from Ventana Medical Systems (clone TF 3H8, $1, 6 \times 10^{-9}$ M) for 1 hour in a humidified chamber at room temperature. The slides were washed with PBS and incubated with biotinylated sheep anti-mouse Ig polyclonal immunoglobulins (GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, France) in PBS at room temperature for 1 hour. The slides were developed by Dako REAL system kit (peroxidase/DAB). After washing with PBS–Tween, the slides were observed under an optical microscope (Carl Zeiss).

Results

We have previously isolated llama-derived sdAbs targeting CEA and demonstrating no cross-reaction with the highly homologous nonspecific cross-reacting antigen (NCA).¹⁷ In the present work, one of these sdAbs demonstrating high affinity to

CEA ($K_D = 8.3$ nM) was engineered by integration of an additional and single C-terminal free cysteine residue (Figure 1, E) for further specific site-directed and oriented conjugation of sdAbs with the QDs (Figure 1, E).

We have further prepared a series of the compact QDs with controlled surface charges covered with PEG-based low-molecular-weight polymers. CdSe-ZnS QDs with quantum yield of around 70% were synthesized as described earlier²⁰ (Supplementary Figure S1, available online at <http://www.nanomedjournal.com>) and solubilized in water by replacement of the TOPO/TOP ligands from their surface with DL-Cys.²¹ The resulting water-soluble QDs displayed bright photoluminescence with a quantum yield close to 40% at room temperature (see Supplementary Table S1). Then, DL-Cys was replaced from the surface of QDs with polyethylene glycol (PEG) derivatives terminating with the OH-, COOH- or NH₂-valences or with mixtures of these PEGs used at desired ratios.²² The procedure described yielded stable and compact PEG-functionalized QDs with hydrodynamic diameters <9 nm and quantum yield of around 50%. Zeta potentials of QDs prepared using mixtures of three-functional PEGs of different charges are presented in Supplementary Table S2. PEG-functionalized QDs of different charges were further screened to identify QDs demonstrating minimal nonspecific binding to cells and tissues. QDs solubilized with a mixture of 90% hydroxyl-PEG and 10% amino-PEG polymers or with 100% hydroxyl-PEG polymer demonstrated lowest nonspecific binding with cells and tissues (Supplementary Table S2) and were selected for conjugation with the sdAbs using Sulfo-SMCC or PMPI reaction, respectively (Figure 2).

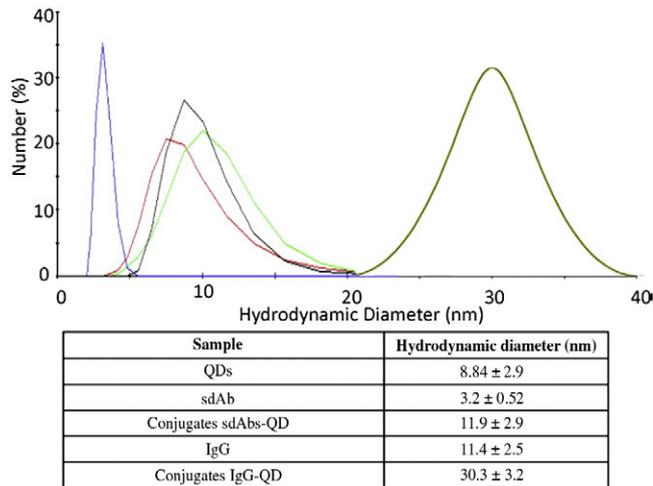


Figure 3. Dynamic light scattering measurement of sdAbs, QDs, sdAb-QD conjugate, and commercial mAb-QD conjugate purchased from Invitrogen.

Sulfo-SMCC conjugation reaction is the standard conjugation procedure used for preparation of commercially available QD conjugates supplied by Invitrogen.⁵ This reaction tags available amino groups of the surface of QD with SH groups of biomolecules (Figure 2, A). In our case, the single amino acid available for conjugation with the SH group of sdAb is that of the Cys amino acid residue integrated by us in the C terminus of sdAbs (Figure 1, E). PMPI conjugation reaction tags hydroxyl groups of the surface of QD with the exposed SH group of the sdAbs (Figure 2, B). So, both conjugation reactions enable selective and oriented conjugation of sdAbs through the single available Cys residue specifically introduced by us at the C-terminal part of the sdAb, with the surface of QDs specifically functionalized for these reactions. All conjugated sdAbs are bound with the QD through the same group and have the same orientation relative to the surface of QD (Figure 2).

Both types of sdAbs-QD conjugates, prepared through sulfo-SMCC or PMPI reactions, were purified by gel-exclusion chromatography with Sephadex-200 resin columns. sdAbs/QD molar ratios within the conjugates were calculated through evaluation of protein content of conjugate by Bradford assay²³ and calculation of QDs concentration using known coefficients of extinction of QDs in the first exciton.²⁴ sdAbs/QD molar ratios within the sdAbs-QD conjugates prepared by sulfo-SMCC or PMPI conjugation reactions were found to be around four sdAbs per one QD.

Dynamic light scattering studies were performed according to Doose et al²⁵ and demonstrated that the conjugation of QDs and sdAbs prepared by us gives rise to extremely compact nanoprobes with very small hydrodynamic radii. Figure 3 shows that the hydrodynamic diameters of sdAbs-QD conjugates (11.9 nm) were only slightly larger than diameters of non-conjugated QDs (8.84 nm) and much smaller than commercially available IgG-QDs conjugates (30.3 nm). Data show that the volumes of sdAbs-QD conjugates were 16 times smaller than those of commercially available IgG-QD conjugates (Figure 3 and Supplementary Figure S2).

Table 1

Median fluorescence (MF) intensities for MC38 and MC38CEA stained in PBS with anti-CEA sdAbs-QD conjugates prepared using sulfo-SMCC or PMPI conjugation reactions

Samples	Dilutions	MC38*	MC38CEA*	Ratio of MF for MC38CEA/MC38
QD control	1/20	31	41	1.3
	1/50	25	37	1.5
	1/100	24	35	1.5
sdAbs-QD conjugates prepared using sulfo-SMCC reaction	1/20	270	625	2.3
	1/50	99	330	3.3
	1/100	76	223	2.9
sdAbs-QD conjugates prepared using PMPI reaction	1/20	29	338	11.7
	1/50	24	229	9.5
	1/100	23	194	8.4

* Autofluorescence for both kinds of cells was around 19 units of MF.

Table 2

Median fluorescence (MF) intensities of MC38 and MC38CEA cells stained with anti-CEA sdAbs-QD conjugates diluted in PBS or in human serum

Medium	Dilutions	MC38*	MC38CEA*	Ratio of MF for MC38CEA/MC38
PBS	1/50	24	229	9.54
	1/100	23	194	8.43
	1/200	22	140	6.36
	1/500	19	53	2.79
Human serum	1/50	19	135	7.11
	1/100	17	79	4.65
	1/200	17	62	3.65
	1/500	17	36	2.12

* Autofluorescence for both kinds of cells was 17 MF units.

We further compared the functional activities of sdAbs-QD conjugates prepared using sulfo-SMCC or PMPI conjugation reactions, both providing homogeneous orientations of sdAbs on the surface of QDs but differing in the total surface charge because of the presence of free amino groups at the QD surface in the case of sulfo-SMCC conjugates.

Table 1 shows flow cytometry results of analysis of CEA-expressing MC38 cancer cells (MC38CEA), compared with MC38 cells not expressing CEA antigen (MC38), with sdAbs-QD conjugates prepared using sulfo-SMCC or PMPI conjugation reaction at the same ratios sdAb/QD = 4. Samples were diluted in PBS buffer containing 1% BSA. Data show that although sdAbs-QD conjugates prepared using the sulfo-SMCC reaction demonstrated much higher MF intensities, they also generated much higher nonspecific binding revealed by their strong interaction with MC38 cells not expressing CEA antigen.

The difference in specificities of conjugates prepared according to sulfo-SMCC or PMPI reactions was the most spectacular when low dilutions of conjugates were used. Table 1 shows that although the MF intensities after MCF38CEA cells staining with sulfo-SMCC conjugates was 625 units compared to 338 units for PMPI conjugates, sulfo-SMCC showed nearly

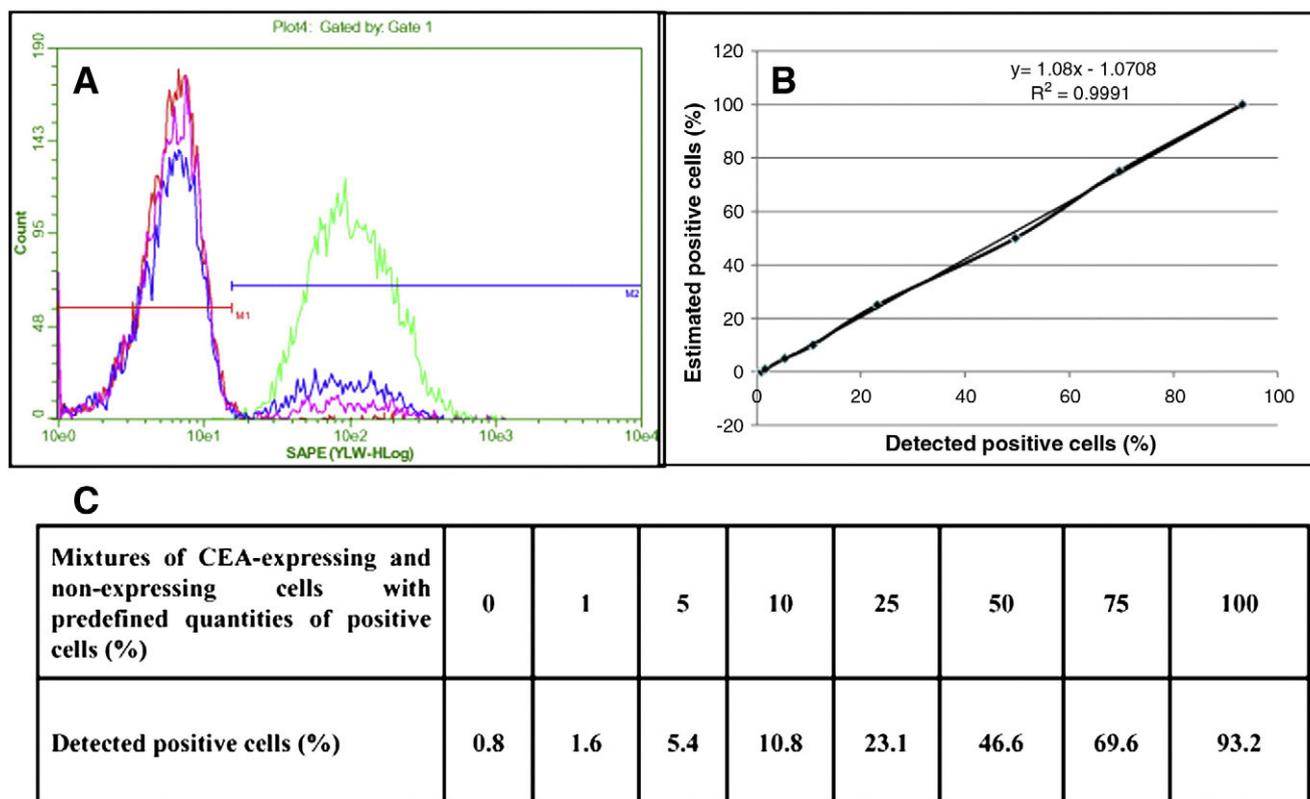


Figure 4. Discrimination of CEA-positive (MC38CEA) and CEA-negative (MC38) cells in their mixture using sdAbs-QD conjugates. **(A)** Histogram of mixture of MC38CEA and MC38 cells according to intensity of staining with sdAbs-QD conjugates. MF intensity of MC38 (M1) was 5.7, and MF intensity of MC38CEA (M2) was 95.7. Red, 100% MC38; pink, 90% MC38–10% MC38CEA; blue, 75% MC38–25% MC38CEA; green, 100% MC38CEA. **(B)** Calibration curve for quantitative detection of MC38CEA cells in mixtures of MC38CEA and MC38 cells. **(C)** Samples used for assay calibration for quantitative detection of MC38CEA cells within mixture of MC38CEA and MC38 cells.

10 times higher nonspecific binding to MC38 cells (270 against 29 units). Best signal-to-noise ratios (11.7 against 2.3) were thus obtained with PMPI conjugates, which contain only hydroxyl groups on the surface of QDs, unlike sulfo-SMCC conjugates with some quantity of free amino groups on the QD surface. PMPI conjugates (Figure 2, B) were thus chosen for further studies of prepared sdAbs-QD conjugates and their application to flow cytometry and immunohistochemistry diagnostic platforms (Figure 2).

We have further analyzed comparative MF intensities for staining of MC38 or MC38CEA cells with sdAbs-QD conjugates in PBS buffer or in human serum. This experiment was necessary to check the stability of prepared conjugates in biological fluids before their integration in clinical diagnostic assays. Table 2 shows that conjugates were stable in human serum and bound specifically to CEA-expressing cells. Moreover, MF intensities obtained by flow cytometry for mixtures of conjugates with MC38 cells not expressing CEA were found to be identical to autofluorescence of cells, thus demonstrating complete absence of nonspecific binding. These data clearly demonstrate applicability of sdAbs-QD conjugates for the development of in vitro clinical diagnostic assays operating in human serum.

The experiments described here demonstrated that sdAbs-QD nanoprobe specifically binds CEA, which is a cell surface

receptor expressed in a high percentage of human tumor cells. We have also shown that sdAbs-QD are stable and retain target specificity to CEA-expressing tumor cells in human serum. Therefore, our results demonstrate the possibility to use sdAb-conjugated nanoparticles for the detection of CEA-expressing tumor cells by flow cytometry diagnostic assays. The next experiment was devoted to demonstration of the possibility of quantitative determination of very rare tumor antigen-expressing cells in the probes containing both pathological and healthy cells.

Figure 4 shows the results of flow cytometry analysis of the mixtures of MC38CEA and MC38 cells prepared at different ratios and stained with sdAbs-QDs conjugates in human serum. The cutoff value of fluorescence intensity was chosen to minimize the percent of positive cells at 0.04% and 0.14% when autofluorescence of MC38CEA and MC38 cells were measured, respectively. MF intensities of MC38 cells were between 5.7 and 6.0, whereas the MF intensities of MC38CEA cells were between 93.2 and 105.4, thus ensuring easy discrimination of positive and negative cells in these mixtures (see Supplementary Figures S3 and S4). The background signal measured on MC38 cells (corresponding to false-positive cells) was as small as 0.82%. These results show excellent correlation between the quantity of cells detected as CEA-positive and the

real quantity of CEA-positive cells in prepared mixtures (Figure 4, C). Moreover, [Supplementary Figure S4](#) shows that even 1% of CEA-positive cells could easily be discriminated in an excess of 99% MC38, thus confirming the high specificity of flow cytometry detection with sdAbs-QD conjugates.

The last series of experiments of this work were devoted to demonstration of the possibility of integration of sdAbs-QD conjugates within an immunohistochemical diagnostic platform operating on human biopsy samples. Figure 5 shows results of immunohistochemical studies on human appendix samples where epithelial cells within epithelial crypt appeared clearly when stained using different techniques. CEA staining using a CEA-specific mAb detected via a secondary biotinylated antibody followed by streptavidin–horseradish peroxidase and chromogen DAB treatments, corresponds to the gold standard of anatomopathological analysis. This technique applied to our samples shows extracellular CEA secreted in the mucin of the crypts stained in dark brown; the cytoplasm and both apex and basal membranes were also stained in brown, which showed the detection of intracellular CEA in whole cells but not in nuclei (Figure 5, A).

Staining of human biopsy samples with sdAbs-QD conjugates provided immunolabeling of quality comparable or, in some aspects, superior to the quality obtained with the DAB-based gold standard protocol and permitted clear discrimination of tumor and nonpathological tissue areas (Figure 5, B). By using CEA-specific sdAbs-QD conjugates emitting fluorescence at 570 nm, extracellular CEA secreted in the mucin of the crypts was clearly visible in yellow because of the fluorescence of QDs. The cytoplasm and both apex and basal membranes were also stained in yellow, which showed the detection of intracellular CEA in whole cells but not in nuclei. Indeed, cell nuclei were not stained in yellow but remained blue, which corresponds to autofluorescence observed under UV excitation from 350 to 400 nm (Figure 5, B). It is worth mentioning that all cells on the slides that were not stained with sdAbs-QD conjugates exhibited blue autofluorescence emission under UV excitation. Thus, the strong staining of CEA in the epithelial crypts was similar to and even thinner and more detailed in quality for direct single-stage labeling of biopsy samples with sdAbs-QD conjugates observed by fluorescence microscopy than that for the gold standard multistep protocol employing CEA-specific mAbs revealed with secondary biotinylated Abs, streptavidin–horseradish peroxidase, DAB chromogen agent, and observed by optical microscopy (Figure 5, A and B).

sdAbs-QD–based fluorescence detection was also compared to standard fluorescence detection procedure employing biopsy samples staining with CEA-specific mAbs revealed with polyclonal goat anti-mouse IgG-FITC conjugates. Figure 5, C shows that the extracellular CEA secreted in the mucin was visible through the green fluorescence of FITC in the lumen crypts. The green staining was also restricted in the apex of some epithelial cells around the lumen and allowed the detection of membrane-bound CEA. The cytoplasm of the epithelial cells and the lamina propria of peripheral mucosa did not show green staining but only yielded brown-colored autofluorescence when observed under the blue excitation in the range from 420 to 490 nm (Figure 5, C). Thus, on appendix slides, detection sensitivity

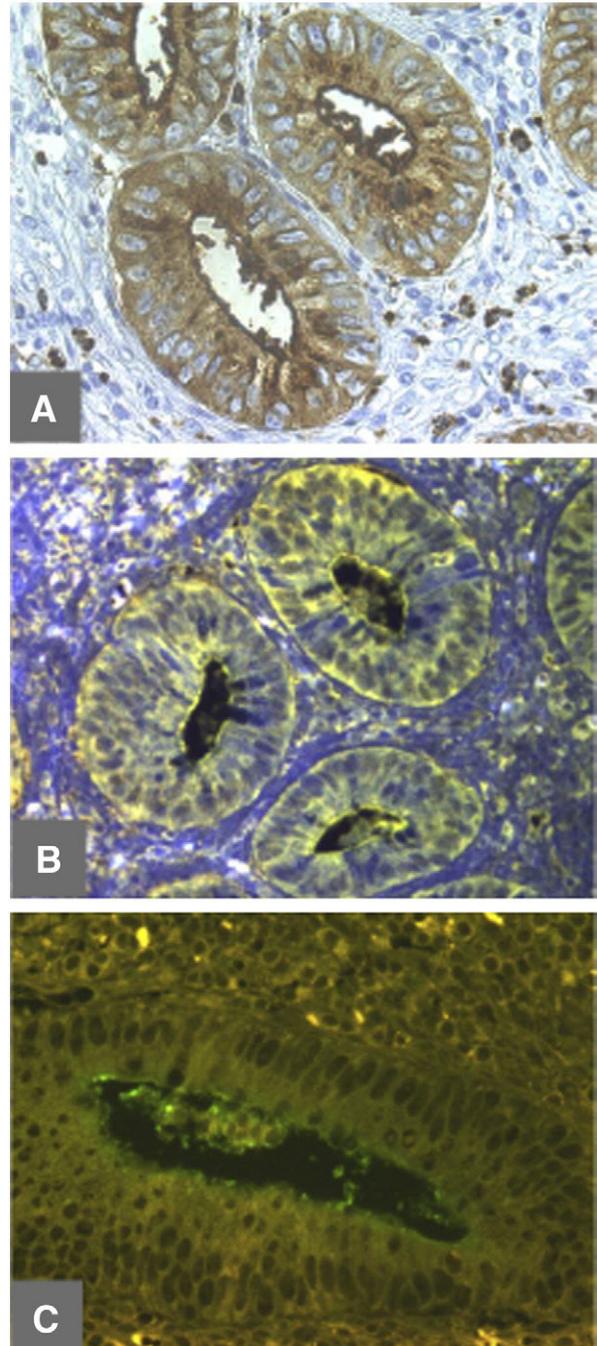


Figure 5. Comparative histochemical immunostaining of patient appendix epithelial crypts with sdAbs-QD conjugates and using conventional techniques. (A) CEA is revealed in brown with CEA-specific IgG and DAB chromogen, observed by visible-light microscopy. (B) CEA is revealed in yellow by CEA-specific sdAbs covalently coupled to QD570, observed by epifluorescence microscopy. (C) CEA is revealed in green by mouse anti-CEA IgG and anti-mouse IgG-FITC, observed by epifluorescence microscopy.

of CEA was dramatically improved when sdAbs-QD conjugates were used instead of mAbs revealed with IgG-FITC (compare Figure 5, B and C). Additionally, [Supplementary Figure S5](#) shows side-by-side comparison of normal and tumor tissue where the last areas are specifically labeled with the sdAbs

conjugates, thus providing clear discrimination of pathological and healthy areas. In conclusion, sdAbs-QD conjugates are shown to be able to stain all antigenic sites that were revealed with gold standard anatomopathological diagnostics, whereas many antigenic sites were not visible when the organic fluorochrome was used according to the conventional fluorescence-based medical diagnostics protocol.

Discussion

We have developed a new generation of ultrasmall nanoprobes by using the smallest (13 kDa) functional Ab fragment—a high-affinity ($K_D = 8.3$ nM) CEA-specific single-domain antibody or “nanobody”—conjugated with compact CdSe-ZnS QDs in a highly oriented manner. Oriented conjugation of the antibodies with nanoparticles or surfaces (through sugar moieties, for example) is known to provide the nanoprobes with higher specificity than that for their random conjugation using carbodiimide chemistry.^{26,27} In our case, a high degree of orientation was achieved as a result of site-directed conjugation of QDs with sdAbs through an additional and single cysteine residue specifically integrated by us within the C terminal of the sdAb amino acid sequence. The developed nanoprobes contain four homogeneously oriented copies of sdAbs on the surface of each QD and have a hydrodynamic diameter below 12 nm.

The described experiments demonstrate that sdAbs-QD nanoprobes specifically bind CEA, which is a cell surface receptor expressed in a high percentage of human tumor cells. We have also shown that sdAbs-QD conjugates are stable and retain target specificity to CEA-expressing tumor cells in human serum and demonstrate excellent specificity and sensitivity for the quantitative detection of tumor biomarkers and rare biomarker-expressing cells using a flow cytometry approach.

The higher diffusibility of sdAbs used for the preparation of these ultrasmall nanoprobes should make them good candidates for immunohistochemical analysis of thick tissues not accessible to IgG. Our data show that sdAbs-QD conjugates stain the antigens in a more delicate manner than common antibodies and lead to biopsy tissue labeling displaying an equivalent or even better quality than that obtained with gold standard immunohistochemical diagnostics based on the use of DAB chromogenic dye. The developed ultrasmall and highly oriented sdAbs-QD nanoprobes will find numerous applications in multiplexed high-throughput diagnostics and fluorescence resonance energy transfer–based detection platforms.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.nano.2011.07.007](https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.07.007).

References

- Xing Y, Rao J. Quantum dot bioconjugates for in vitro diagnostics & in vivo imaging. *Cancer Biomarkers* 2008;4:307-19.
- Nabiev I, Sukhanova A, Artemyev M, Oleinikov V. Fluorescent colloidal particles as a detection tools in biotechnology systems. In: Elaissari A, editor. *Colloidal nanoparticles in biotechnology*. New York: Wiley; 2008. p. 133-68.
- Amit A, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* 1986;233:747-53.
- Pathak S, Davidson MC, Silva GA. Characterization of the functional binding properties of antibody conjugated quantum dots. *Nano Lett* 2007;7:1839-45.
- Invitrogen. Qdot antibody conjugation kits. Available at: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp19010.pdf>.
- Mahmoud W, Rousserie G, Reveil B, Tabary T, Millot JM, Artemyev M, et al. Advanced procedures for labelling of antibodies with quantum dots. *Anal Biochem* 2011;416:180-5.
- Yang L, Mao H, Wang YA, Cao Z, Peng X, Wang X, et al. Single chain epidermal growth factor receptor antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor targeting and imaging. *Small* 2009;5:235-43.
- Attarwala H. Role of antibodies in cancer targeting. *J Nat Sci Biol Med* 2010;1:53-6.
- Cardoso DF, Nato F, England P, Ferreira ML, Vaughan TJ, Mota I, et al. Neutralizing human anti crotoxin scFv isolated from a nonimmunized phage library. *Scand J Immunol* 2000;51:337-44.
- Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005;23:1126-36.
- Saerens D, Kinne J, Bosmans E, Wemery U, Muyltermans S, Conrath K. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J Biol Chem* 2004;279:51965-72.
- Perruchini C, Pecorari F, Bourgeois JP, Duyckaerts C, Rougeon F, Lafaye P. Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol* 2009;118:685-95.
- Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 2002;11:500-15.
- Olichon A, Schweizer D, Muyltermans S, de Marco A. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. *BMC Biotechnol* 2007;7:7-14.
- Zaman MdB, Nath Baral T, Zhang J, Whitfield D, Yu K. Single-domain antibody functionalized CdSe/ZnS quantum dots for cellular imaging of cancer cells. *J Phys Chem C* 2009;113:496-9.
- Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999;9:67-81.
- Behar C, Chames P, Teulon I, Cornillon A, Alshoukr F, Roquet F, et al. Llama single-domain antibodies directed against nonconventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen absent from nonspecific cross-reacting antigen. *FEBS J* 2009;276:3881-93.
- Annunziato ME, Patel US, Ranade M, Palumbo PS. *p*-maleimidophenyl isocyanate: a novel heterobifunctional linker for hydroxyl to thiol coupling. *Bioconjug Chem* 1993;4:212-8.
- Even-Desrumeaux K, Baty D, Chames P. Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation. *Mol BioSyst* 2010;6:2241-8.
- Wargnier R, Baranov AV, Maslov VG, Stsiapura V, Artemyev M, Pluot M, et al. Energy transfer in aqueous solutions of oppositely charged nanoassemblies of CdSe/ZnS core/shell quantum dots and in quantum dot–nanogold assemblies. *Nano Lett* 2004;4:451-7.
- Sukhanova A, Venteo L, Devy J, Artemyev M, Oleinikov V, Pluot M, et al. Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections. *Lab Invest* 2002;82:1259-62.
- Williams Y, Sukhanova A, Nowostawska M, Davies AM, Mitchell S, Oleinikov V, et al. Probing cell type-specific intracellular nanoscale barriers using size-tuned quantum dots. *Small* 2009;5:2581-8.
- Bio-Rad Laboratories. Bio-Rad protein assay. Available at: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf.

24. Jasieniak J, Smith L, van Embden J, Mulvaney P, Califano M. Re-examination of the size-dependent absorption properties of CdSe quantum dots. *J Phys Chem C* 2009;113:19468-74.
25. Doose S, Tsay JM, Pinaud F, Weiss S. Comparison of photophysical and colloidal properties of biocompatible semiconductor nanocrystals using fluorescence correlation spectroscopy. *Anal Chem* 2005;77:2235-42.
26. Puertas S, Moros M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Grazu V, de la Fuente JM. Designing novel nano-immunoassays: antibody orientation vs sensitivity. *J Phys D: Appl Phys* 2010;43:474012.
27. Puertas S, Batalla P, Moros M, Polo E, Pino P, Guisan JM, et al. Taking advantage of unspecific interactions to produce highly active magnetic nanoparticle-antibody conjugates. *ACS Nano* 2011;5:4521-8.

3. Discussion

Nous avons développé une nouvelle génération de nano-sondes fluorescentes grâce aux propriétés remarquables des sdAbs et des QDots. En effet, la petite taille, l'affinité et la spécificité des sdAbs associées à la fluorescence étroite et stable des QDots nous a permis de réaliser des nano-sondes efficaces et spécifiques. La conjugaison orientée des sdAbs à la surface des QDots grâce aux ponts disulfures leur confère une meilleure activité que par conjugaison classique (chimie carbodiimide). Nous avons pu démontrer l'efficacité de ces nano-sondes dans différentes expériences d'immunomarquages telles que la cytométrie de flux et l'immunohistochimie. Ces nano-sondes présentent un très grand potentiel en détection multiparamétrique, en détection monométrique, en détection monomoléculaire, en dosage *in vitro* et en perspective de ciblage *in vivo*.

La petite taille des sdAbs représente l'avantage majeur dans l'application démontrée ci-dessus. En effet, la petite taille de ces derniers est primordiale pour ne pas perturber l'activité de la sonde après la fixation. Par exemple, la fixation de mAbs, de 150 kDa, et d'environ 15 nm de longueur, à un QDots de 20 nm va fortement altérer son activité et sa pénétration tissulaire. Au contraire, la fixation de sdAbs de 4 nm de longueur va beaucoup moins perturber le QDots et la pénétration tissulaire restera optimale. Un autre gros avantage de l'utilisation des sdAbs-cystéine est la possibilité de coupler ces sdAbs de façon covalente et orientée à la surface du QDots. En effet, dans la majorité des cas, les nano-sondes sont réalisées avec des mAbs couplés à une molécule sonde de façon chimique, donc non orientée et entraînant souvent une altération de l'anticorps. Une autre approche couramment utilisée est le système biotine/streptavidine. Mais cette approche implique de recouvrir les QDots de streptavidine, une protéine de 60 kDa, ce qui influe donc fortement sur la taille finale de la nano-sonde. Un dernier avantage majeur de l'utilisation des sdAbs dans cette approche est leur grande stabilité. En effet, la plupart des sdAbs peuvent être produits efficacement dans le cytoplasme bactérien et ne nécessitent aucune formation de ponts disulfures pour leur repliement et leur activité. Ainsi, les sdAbs contenant une extra-cystéine sont produits tout simplement dans le cytoplasme d'*E. coli* et se révèlent totalement solubles et fonctionnels. Au cours de leur stockage, une dimérisation des sdAbs peut se produire mais leur conservation en milieu réducteur ou une réduction au moment du couplage est tout à fait réalisable, et ne perturbe en rien leur activité.

Nous avons démontré la possibilité de fonctionnaliser des QDots avec les sdAbs, mais cette approche peut être envisagée dans de nombreuses autres applications. Par exemple, les "nanoshells" ou nanoballes sont constituées de petites particules de silice d'un diamètre de 110 nm, recouvertes d'une couche d'or épaisseur 10 nm s'échauffant quand une lumière se situant dans l'infrarouge proche est envoyée sur les particules, et capables de détruire des cellules cancéreuses à proximité par hyperthermie (augmentation locale de la température) (Bardhan, Lal et al. 2011). Il est possible de fabriquer des nanoballes capables de cibler spécifiquement les tumeurs en les fonctionnalisant avec des anticorps spécifiques de cellules cancéreuses. Un autre exemple qui peut être cité est les nanotubes de carbone (Lay, Liu et al. 2011). Ces derniers sont fluorescents lorsque l'on s'approche de l'infra-rouge, et dans cette partie du spectre, les tissus humains et les liquides sont transparents. Cette caractéristique est intéressante car elle rend les nanotubes détectables avec une grande spécificité et sensibilité dans les tissus. Les nanotubes de carbone peuvent aussi détruire la tumeur par hyperthermie induite par résonance magnétique (Gomez-Gualdron, Burgos et al. 2011).

Une autre approche utilisée pour mieux repérer les cellules tumorales est l'utilisation des nanoparticules biphotoniques (West and Halas 2003). Ces nanoparticules en silice renferment des fluorophores organiques capables d'absorber l'énergie de deux photons, lorsque deux particules chargées électriquement interagissent. Ce fluorophore organique possède une longueur d'onde proche de l'infrarouge et peut réémettre par fluorescence un rayonnement utilisé pour l'imagerie médicale. Toujours sur le même principe, une greffe sur les nanoparticules des éléments de reconnaissance de certaines tumeurs, comme des anticorps, permet alors au complexe de cibler des cellules spécifiques.

Une dernière approche est l'utilisation de nanoparticules magnétiques composées d'un cœur en fer pur, et fonctionnalisées pour se fixer sélectivement sur la tumeur (Baptista, Doria et al. 2011). Elles sont utilisées pour une application en imagerie et en hyperthermie. Pour l'imagerie, leur accumulation dans la tumeur à détruire permettra une meilleure visualisation de celle-ci par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), ce qui fera que le traitement sera plus précis. Pour l'hyperthermie, les nanoparticules magnétiques seront utilisées comme sources locales de chaleur. Ensuite il y aura la mise en place d'un champ magnétique alternatif qui génèrera une augmentation de température au sein de la tumeur, ce qui la rendra alors plus vulnérable à tout traitement. L'efficacité de la chimiothérapie ou de la radiothérapie sera ainsi améliorée sans avoir à augmenter les doses, mais aussi et surtout sans augmenter les effets secondaires.

Voilà donc de nombreuses applications diagnostiques et thérapeutiques où les sdAbs contenant une extra cystéine pourraient être l'outil idéal pour la fonctionnalisation des nanoparticules.

Conclusions et perspectives

Dans la population générale, le bénéfice du dépistage mammographique du cancer du sein en termes de mortalité évitée est démontré dans la tranche d'âge 50-69 ans. Dans cette tranche d'âge, le dépistage systématique est donc recommandé. Mais le dépistage systématique et gratuit du cancer du sein n'est aujourd'hui réservé qu'aux femmes de plus de 50 ans. Mais, parmi les 50.000 nouveaux cas de cancer du sein détectés chaque année, pas moins de 27 % des cas sont malheureusement déclarés avant l'âge de 50 ans. Environ 10 % d'entre eux touchent des femmes de moins de 40 ans (2 % ont moins de 35 ans, 7 % ont entre 35 et 39 ans), dont les tumeurs sont souvent dépistées tardivement et sont donc plus difficiles à traiter.

En termes de diagnostic d'un cancer du sein primaire, la palpation du sein, la mammographie et la biopsie sont efficaces mais ces techniques restent lourdes et coûteuses et ne sont pas adaptées pour un suivi de routine des patientes. Le diagnostic de l'état métastatique quand à lui est encore plus contraignant. Il n'existe aucun moyen simple et fiable de détecter la présence de métastases dans tout le corps.

Grâce aux résultats de l'ensemble des examens diagnostiques, le médecin peut évaluer le stade de la maladie et ainsi élaborer une stratégie thérapeutique. Les principaux traitements utilisés dans le cadre du cancer du sein sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie. Plus récemment de nouvelles approches sont arrivées en clinique, comme par exemple l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour l'immunothérapie passive. L'Herceptin qui permet de traiter certains cancers possédant à leur surface un grand nombre de récepteurs HER2 en est le meilleur exemple. Contrairement à la chimiothérapie, l'action de ces nouvelles molécules est très ciblée et entraîne ainsi moins d'effets secondaires. Actuellement, un très grand nombre de molécules sont en développement, mais la diversité des antigènes ciblés par ces anticorps reste très faible.

Nous comprenons donc très bien ici la nécessité, que ce soit pour des approches de dépistage, de diagnostic ou de thérapie ciblée, de découvrir de nouvelles cibles et d'isoler de nouveaux anticorps correspondants à ces cibles.

1. Conclusion et discussion

Pour essayer de répondre à toutes ces attentes, nous avons mis au point différents systèmes efficaces. Tout d'abord, en ce qui concerne l'utilisation des sdAbs pour différents essais diagnostiques. Dans les immunoessais, les anticorps sont utilisés généralement pour la

capture et/ou la détection d'un antigène. Il était donc primordial de mettre au point des systèmes efficaces pour l'immobilisation d'anticorps sur différents types de support ainsi que des stratégies permettant une détection spécifique utilisant les sdAbs. Pour l'immobilisation des sdAbs, deux stratégies ont été mises au point : une première consistant en l'utilisation de sdAbs biotinylés de façon enzymatique *in vivo* en C-terminal, pour une immobilisation sur un support recouvert de streptavidine, et une seconde stratégie consistant en l'immobilisation de sdAbs contenant une multi étiquette, toujours en C-terminal, pour une immobilisation avide et orientée. Il était également primordial de mettre au point une technique efficace pour utiliser les sdAbs pour la détection d'antigènes. Pour cela, l'ajout d'une extra cystéine en C-terminal de l'anticorps nous a permis de fonctionnaliser des QDots pour réaliser des marquages.

Ensuite, après avoir mis au point ces techniques pour une utilisation rapide et facile des sdAbs, il nous a fallu isoler des sdAbs spécifiques pour une utilisation dans le diagnostic du cancer du sein. Pour ce faire, nous avons mis au point une stratégie innovante permettant d'isoler principalement des sdAbs cancer-spécifiques, avec un très bon rendement. Nous avons pu isoler différents sdAbs pour lesquels nous avons validé la spécificité.

Pour finir, nous avons montré la possibilité d'utiliser nos sdAbs dans différentes applications, diagnostiques ou avec une visée plus thérapeutique. Tout d'abord nous avons montré la capacité d'utiliser nos anticorps pour des techniques classiques de diagnostic tel que l'ELISA ou l'IHC. Puis, nous nous sommes intéressés à des approches plus innovantes telles que la réalisation d'une puce en phase liquide pour la détection multiplexée de biomarqueurs dans un échantillon complexe tel que du sérum. Une deuxième approche a constitué en l'enrichissement de cellules rares dans un objectif de diagnostic de cancers métastatiques par la détection de CTCs.

1.1. L'identification de cibles

Une étape majeure du processus décrit pour la découverte de nouvelles cibles est bien évidemment l'identification d'antigènes reconnus par les anticorps isolés. C'est au niveau de cette étape que nous avons rencontré de nombreuses difficultés qui nous ont limités dans nos avancées. Nous avons montré la possibilité, grâce à la disponibilité de sdAbs, de réaliser des immunoprécipitations (IP) pour ensuite identifier la protéine immunoprécipitée par spectrométrie de masse. Après avoir testé différentes approches pour réaliser les IPs, comme l'utilisation de l'étiquette 6 histidines pour capturer les sdAbs sur des billes de nickel ou bien le couplage direct à des billes époxy, nous avons finalement constaté que la meilleure stratégie

pour réaliser l'expérience était d'utiliser des sdAbs biotinylés *in vivo* et des les immobiliser sur des billes de streptavidine. Grâce à cette méthode, nous avons pu réaliser plusieurs IPs qui ont bien fonctionné. Mais cette stratégie a plusieurs limites et son efficacité n'est pas optimale. Il faut tout d'abord que l'anticorps fonctionne en IP, ce qui n'est pas toujours le cas. Ensuite, nous avons été confronté à un problème de bruit de fond assez important, qui rend d'autant plus difficile l'identification de la bande spécifiquement immunoprécipitée en coloration au bleu de coomassie. De plus, si notre anticorps reconnaît un antigène peu exprimé, l'IP n'est pas alors pas une technique suffisamment efficace et sensible. Pour finir, dans le cas des sdAbs dirigés contre des protéines membranaires, les IPs se sont montrées encore plus délicates, car en effet il fallait partir d'un échantillon contenant ces antigènes membranaires, donc contenant la membrane plasmique, et les problèmes de bruit de fond se sont alors encore amplifiés. Les sdAbs reconnaissant dans la majorité des cas des épitopes conformationnels, ils ne fonctionnent que très rarement en western blot, ce qui limite encore la possibilité d'identifier spécifiquement la bande immunoprécipitée.

Une autre possibilité envisageable pour identifier nos cibles membranaires serait d'utiliser l'étiquette 6 histidines pour capturer nos anticorps sur des billes de nickel. En effet, même si cette technique d'immobilisation s'est révélée moins efficace que l'utilisation du système biotine streptavidine dans nos systèmes modèles, elle nous a quand même permis d'obtenir des résultats corrects. Grâce à ce système, nous pourrions utiliser le système biotine streptavidine pour la détection de nos IPs en western blot. En effet, si les cellules encore entières sont biotinylées avant leur lyse pour l'immunoprécipitation, les protéines immunoprécipitées pourraient être détectées en western blot grâce à de la streptavidine marquée (Goenaga, Zhou et al. 2007). De ce fait, nous pourrions plus facilement identifier les IPs qui fonctionnent et ensuite travailler en plus gros volume de réaction pour réaliser les gels pour l'analyse par spectrométrie de masse, en sachant déjà à quelle taille se situe la bande spécifique à analyser.

Une stratégie alternative que l'on pourrait utiliser pour l'identification des cibles est le criblage de banques d'ADNc. Ce système, très puissant et très sensible, peut être utilisé pour identifier les gènes codant pour des protéines interagissant physiquement (protéines cible) avec une protéine donnée (protéine appât, ici notre sdAb). Ce système a déjà montré ses capacités dans la caractérisation précise de cibles de scFv (Vielemeyer, Nizak et al. 2010) et pourrait apporter une réponse à notre problème. Il s'agit, à partir d'un échantillon (tissu, cellules) contenant la cible à identifier, d'extraire les ARNm puis d'obtenir les ADNc par

transcription inverse. Ensuite, les ADNc sont clonés dans un vecteur adapté en fonction de l'objectif. Ce système peut être utilisé pour réaliser des criblages par double hybride, chez la levure ou la bactérie, ou par phage display chez la bactérie. Le système du double hybride fonctionne en milieu réducteur, mais nous avons déjà prouvé la fonctionnalité des sdAbs dans ces conditions.

Le double hybride a été mis au point en utilisant l'interaction entre 2 protéines de levure, SNF1 et SNF4 (Fields and Song 1989). La cible peut être constituée d'une banque génique. Dans ce cas, tous les ADN complémentaires ou le génome codant toutes les protéines d'un organisme ou d'un tissu sont criblés afin de répertorier toutes les protéines interagissant avec la protéine d'intérêt, donc dans notre cas l'anticorps. Toutefois cette méthode présente des inconvénients, le principal étant l'utilisation de l'organisme levure qui rend le travail laborieux du fait de sa faible vitesse de croissance et de la nécessité de passer par des étapes de sous clonage en bactérie.

Pour pallier ce problème, d'autres systèmes de double hybride ont vu le jour ces dernières années. C'est suite à la découverte de la possibilité d'une interaction arbitraire entre une protéine liée à l'ADN et l'ARN polymérase bactérienne activant la transcription (Dove, Joung et al. 1997) puis à la mise en évidence de l'importance du promoteur fixé aux deux partenaires d'interaction (Hochschild and Dove 1998) que l'équipe de Joung a transféré la technique de double hybride de la levure à la bactérie *E. coli* (Joung 2001). Dove *et al.* a montré que ces contacts peuvent être remplacés par des interactions protéine-protéine artificielles (Dove, Joung et al. 1997). Le double hybride bactérien chez *E. coli* repose donc également sur l'activation d'un gène rapporteur suite à l'interaction de deux protéines recombinantes. Les avantages d'un système double hybride bactérien sont nombreux. Les plus importants sont le fait que les bactéries croissent plus rapidement que la levure et ont un plus fort rendement de transformation, permettant un criblage plus important, plus rapide et sans étape d'extra-transformation.

Le système phage display peut être utilisé pour produire à la surface des phages des peptides correspondant à la banque d'ADNc qui sont des ligands potentiels du sdAb dont la cible doit être déterminée (Xiao, Zhang et al. 2006). L'anticorps est immobilisé sur un support et mis en présence de la banque de phage-peptides pour la sélection. Puis, les clones contenant la cible peuvent être localisés par criblage classique en ELISA, pour finalement être identifiés par séquençage. L'utilisation d'un phage lytique, comme le T7, pour ce type d'application est plus adapté que l'utilisation d'un phage filamenteux non lytique car la production des

particules de phage-peptide ne nécessite pas dans ce cas d'étape de sécrétion par la membrane interne bactérienne. En effet, cette étape peut perturber la production et le repliement correct du peptide présent à la surface du phage.

Une des étapes importantes pour ce type de stratégie est la construction de la banque d'ADNc. En effet, l'expression d'une banque d'ADNc par phage display est rarement utilisée car souvent inefficace en raison des décalages de cadre de lecture et des codons stop inévitables. En effet, un très grand pourcentage de clones identifiés à partir de banque d'ADNc classique n'est pas dans le bon cadre de lecture (non-ORF) et code donc pour des peptides non naturels (Li and Caberoy 2010). Il est considéré que seulement 8% des clones produits correspondent à des protéines naturelles (Davis and Benzer 1997). Chez la levure, l'utilisation d'un système eucaryote permet quelques avantages par rapport à l'utilisation de la bactérie en raison de l'homologie des codons avec les mammifères, évitant ainsi les problèmes de traduction de chevauchement. Mais les problèmes du cadre de lecture et des codons stop restent les mêmes et les peptides considérés comme naturels dans ces banques sont estimés à 16% (Holz, Lueking et al. 2001). Des stratégies efficaces ont donc été mises au point pour la construction de banques d'ADNc dont les peptides seront dans le bon cadre de lecture (ADNc ORF). Le principe de construction de ces banques est basé sur le fait que les ADNc non ORF ont une grande fréquence de codon stop (Garufi, Minenkova et al. 2005). Un marqueur ou une étiquette en C-terminal ne sera exprimé que par les ADNc ORF. Ce système est alors utilisé pour sélectionner uniquement les ADNc ORF et générer ainsi des banques ORF. Différentes stratégies ont été mises au point comme par exemple l'introduction d'un gène de résistance à l'ampicilline à l'extrémité 3' de l'ADNc qui permettra, par pression de sélection, d'éliminer les ADNc non ORF (Seehaus, Breitling et al. 1992). Une autre stratégie possible est de fusionner à l'extrémité 3' de l'ADNc une séquence codant pour l'Avitag. Après production de la banque de peptide-phage avec une biotinylation enzymatique *in vivo* chez la bactérie, les ADNc ORF sont sélectionnés sur billes de streptavidine pour la création d'une banque d'ADNc ORF.

Nous voyons donc qu'il existe plusieurs stratégies permettant la génération de banques d'ADNc ORF efficaces pour une utilisation en double hybride ou en phage display pour la découverte des cibles de nos sdAbs. De plus, la création d'une seule banque à partir d'un tissu de cancer du sein sera suffisante pour la découverte de toutes nos cibles, car la même banque pourra être utilisée pour travailler avec tous nos anticorps.

1.2. La réalisation des masques

Nous avons obtenu des anticorps montrant une spécificité tout à fait intéressante pour notre approche. Mais nous pouvons nous poser la question de la pertinence du masque réalisé. En effet, pour l'isolement de nos anticorps spécifiques du cancer du sein, nous avons utilisé pour réaliser notre masque les cellules saines épithéliales du sein HME1. Mais ces cellules restent une lignée cellulaire, et il serait vraiment plus intéressant de travailler avec des cellules saines issues directement de patientes. Une autre approche serait de réaliser un masque vraiment plus large en termes de diversité tissulaire. En effet, la réalisation d'un masque sur un mélange de cellules saines provenant de différents organes permettrait encore d'améliorer l'efficacité du masque et donc de travailler dans une approche cancer, et non plus uniquement cancer du sein.

2. Perspectives

2.1. Du modèle au test clinique

Nous avons montré l'utilisation efficace de nos sdAbs dans de nombreuses applications, mais toutes ces expériences ont été réalisées dans des systèmes modèles. Il serait maintenant primordial de réaliser nos tests pour du diagnostic réel. En effet, pour la puce à sdAbs en phase liquide l'exemple montré ne constitue qu'un modèle réalisé à petite échelle. Il sera par la suite primordial de réaliser ce même type de test avec au minimum une vingtaine de cibles différentes dosées simultanément. En effet, dans le but d'utiliser ce dosage pour une application diagnostique ou pronostique, l'analyse simultanée d'un grand nombre de cibles pertinentes permettra d'obtenir un test spécifique. Comme nous l'avons déjà discuté, l'utilisation d'un seul marqueur, comme le CEA ou le CA15-3, ne permettra jamais d'atteindre une spécificité suffisante pour être utilisé en diagnostic. C'est l'association d'un grand nombre de marqueurs qui pourrait résoudre ce problème de spécificité et permettre de réaliser un dosage suffisamment spécifique. Avec de nombreux anticorps, il serait alors intéressant d'analyser un grand nombre d'échantillons de patientes ou de donneuses saines, afin de réaliser des essais à grande échelle. Nous pourrions ainsi déterminer les sdAbs

réellement intéressants et surtout quelles associations de sdAbs permettent de réaliser le dosage le plus spécifique.

Dans le cas de l'enrichissement de cellules rares par cytométrie de flux, nous avons également utilisé un modèle. En effet, nous avons travaillé sur des lignées cellulaires, mélangé à des CMNS. Il serait maintenant primordial de travailler en conditions réelles, sur des échantillons de patientes atteintes de cancers du sein métastatiques, ainsi que sur des échantillons contrôle, afin de déterminer si nos anticorps se révèlent spécifiques de ces cellules et ainsi d'enrichir de vraies cellules tumorales circulantes avec notre système. Ensuite, grâce à la flexibilité de notre système, nous pourrions déterminer très facilement quels anticorps se révèlent le plus efficaces et permettent d'obtenir le meilleur rendement d'enrichissement.

2.2. L'utilisation du système à haut débit

Pour réaliser nos expériences dans des systèmes diagnostiques réels, une des étapes primordiales est l'isolement d'un grand nombre d'anticorps spécifiques. Dans les 35 dernières années, la technologie des hybridomes a amélioré la capacité de recherche et de diagnostic en procurant des mAb pour détecter et quantifier des molécules cibles cellulaires ou sériques. En supplément de cette méthode traditionnelle, les technologies *in vitro* ont permis d'apporter de nombreux bénéfices. Depuis la conception jusqu'à la réalisation du phage display, l'évolution majeure a été l'expression de fragments d'anticorps en bactéries et l'amplification par PCR de gènes et de banques d'anticorps. Ainsi, les technologies les plus populaires (et complémentaires) que sont le phage et le levure display peuvent être utilisées à partir de répertoires immunisés, naïfs, ou synthétiques. Les avancées dans le domaine de la biologie à haut débit ont drastiquement augmenté la demande de réactifs affins et renouvelables de haute qualité pour une utilisation à l'échelle du protéome. Les méthodes *in vitro* ont le potentiel de significativement améliorer la parallélisations, l'automatisation et la miniaturisation de l'isolement d'anticorps. De plus, de nombreux mAb commerciaux sont peu spécifiques et peu affins, ce qui prouve clairement le besoin d'utiliser des approches robustes pour améliorer la qualité des anticorps isolés. Le potentiel haut débit des technologies *in vitro* en fait l'outil idéal pour les projets à grand échelle d'isolement d'anticorps contre un grand nombre de cibles.

Les étapes de sélection et de criblage des méthodes *in vitro* sont basées sur des systèmes microbiens et sont donc plus adaptables à l'automatisation que les approches utilisant la technique des hybridomes. L'automatisation ainsi que différentes méthodes applicables à haut débit ont montré leur efficacité à différentes étapes du phage display. Par exemple, lors des sélections proprement dites, les expériences peuvent être réalisées en plaque 96 puits, donc permettant de réaliser potentiellement 96 sélections simultanément (Lou, Marzari et al. 2001; Turunen, Takkinen et al. 2009). L'utilisation de pipettes multicanaux et d'un laveur automatique de plaque 96 puits rendent la sélection très rapide et simple (Krebs, Rauchenberger et al. 2001). Entre deux tours de sélection, les cellules TG1 infectées par les phages peuvent être amplifiées en milieu liquide et non sur boîte d'agar, permettant ainsi l'utilisation directe du surnageant de culture pour le tour de sélection suivant après ajout du phage helper (Krebs, Rauchenberger et al. 2001). Pour la réalisation de master plate, il existe des robots permettant le repiquage automatique des colonies en plaque 384 puits. Les criblages par ELISA peuvent être réalisés en plaque 384 puits, ou encore à plus haut débit en utilisant la technologie des puces. Par exemple, nous avons montré la possibilité de réaliser des phage-sdAb ELISA sur lysat de biopsie. Cette approche consiste en un « reverse phase » ELISA, et peut donc être très facilement réalisable pour une approche à haut débit par reverse phase array.

Après obtention des anticorps désirés, le système de sélection *in vitro* du phage display fournit immédiatement le gène et la séquence correspondant aux anticorps sélectionnés. Ceci permet donc un accès direct à de nombreux formats d'anticorps par simple sous clonage, comme par exemple la dimérisation ou multimérisation, la fusion à des enzymes, des étiquettes et des protéines fluorescentes (Bradbury, Sidhu et al. 2011). Tous ces formats peuvent ensuite être utilisés très facilement pour de nombreuses applications aussi bien diagnostiques que thérapeutiques.

2.3. La sélection masquée : une stratégie possible dans de nombreuses applications

Nous avons donc mis au point une technique très efficace de sélection masquée par phage display qui nous permet d'obtenir des sdAbs avec une spécificité très précise à partir d'échantillons complexes. Il est donc très facile d'imaginer utiliser cette stratégie pour de nombreuses applications. Tout d'abord, en ce qui concerne l'isolement de sdAbs dirigés contre des cellules entières, il serait très intéressant d'utiliser des cellules isolées directement

de biopsies de patientes plutôt que des lignées cellulaires. En effet, la culture *in vitro* de lignées cellulaires transforme extensivement les cellules et réduit énormément la diversité moléculaire par rapport à celle présente dans une tumeur fraîche (Rubin 1997). Pour cela, la dissociation mécanique ou enzymatique de tumeur pour la récupération des cellules intactes est une technique maintenant bien au point. Nous pouvons donc facilement imaginer dissocier des tumeurs de cancer du sein pour en récupérer uniquement les cellules et ainsi faire les sélections.

Il pourrait également être intéressant de réaliser des sélections sur des cellules tumorales circulantes ou sur des cellules souches cancéreuses pour trouver de nouveaux marqueurs spécifiques de ces dernières. En effet, la détection des CTCs constitue une grosse part dans l'avenir du diagnostic des cancers métastatiques. Considérées également comme des biopsies liquides, la détection de CTCs permet un diagnostic précoce et non invasif de l'état métastatique avant même l'apparition physique des métastases. Ceci constitue donc un axe majeur de recherche.

Des cellules souches cancéreuses ont récemment été identifiées dans plusieurs tumeurs solides (cancer du cerveau, du sein, du colon, de l'intestin...) et dans les leucémies. Elles sont à l'origine de la transformation de cellules saines en cellules tumorales et elles semblent aussi être à l'origine des métastases et de la récurrence de certains cancers. En effet, des travaux récents ont montré que seul un petit groupe de cellules était responsable de la croissance d'une tumeur (elles représentent moins de 0.1% de la population totale des cellules qui composent une tumeur). Ces cellules souches cancéreuses sont capables comme les cellules souches saines, de s'auto-renouveler, mais elles sont aussi capables de générer des cellules tumorales (Korkaya, Liu et al. 2011). Elles pourraient donc jouer un rôle direct dans le développement des cancers. Certaines tumeurs, si ce n'est toutes, seraient donc composées à la fois de cellules tumorales qui se divisent de manière anarchique et de cellules souches cancéreuses. Ces dernières sont présentes en de très faibles proportions dans les tissus ce qui rend difficile leur étude et sont le plus souvent au repos. Elles échappent donc aux traitements anticancéreux qui ciblent les cellules qui se divisent rapidement, ce qui expliquerait la récurrence de certains types de cancers à l'arrêt du traitement. Les thérapies actuelles traitent toutes les cellules cancéreuses de la même façon. Le défi des prochaines années sera de mettre au point des traitements capables d'éliminer les cellules souches cancéreuses sans toucher aux cellules souches normales de l'organisme. Une des limitations reste d'identifier des cibles spécifiques de cette population cellulaire.

Pour toutes ces applications sur cellules entières vivantes, une des limitations qui peut être rencontrée est la disponibilité des échantillons. En effet, toutes les étapes du processus nécessitent une quantité non négligeable de cellules : 10 millions de cellules par immunisation, sachant qu'un lama est immunisé 4 fois avec les mêmes échantillons ; 5-10 millions de cellules par sélection ; et des criblages par cytométrie où il faut environ 5-10 millions de cellules pour cribler 100 clones. Même si ces quantités doivent pouvoir être réduites, il faut disposer d'un nombre non négligeable de cellules. Après dissociation enzymatique ou mécanique de 1 g de tissu, la récupération de cellules entières est faible. Cependant, il est possible d'utiliser plusieurs systèmes déjà existants pour l'expansion de ces cellules. En effet, il est possible de mettre ces cellules primaires en culture à court terme (environ une dizaine de divisions). Si la culture est correctement faite et reste courte dans le temps, les cellules ne subiront pas ou peu de dérive et pourront être utilisées en étant représentatives de cellules tumorales issues de tumeur. Une autre approche qui peut être utilisée est de xéno greffer des cellules de tumeurs ou la tumeur elle-même afin de multiplier les cellules dans les souris avant de les récupérer (Fichtner, Becker et al. 2004; Cheng, Ramesh et al. 2010).

Nous pouvons également imaginer travailler sur du stroma, ce tissu non tumoral qui joue un rôle de soutien et de nutrition, permettant aux cellules cancéreuses de se développer. Il est constitué comme tout tissu conjonctif de fibroblastes sécrétant les glycoprotéines et la matrice extra cellulaire, de cellules inflammatoires et immunocompétentes, de vaisseaux et de nerfs. L'observation du stroma est largement délaissée dans les méthodologies de diagnostic du cancer du sein. Pourtant, il a été montré récemment que des altérations des cellules composant le stroma pourraient être critiques pour l'évolution d'une maladie du stade bénin au cancer invasif (Cichon, Degnim et al. 2010). D'autres données montrent que le microenvironnement tumoral pourrait avoir un effet sur l'efficacité de la chimiothérapie en termes de sensibilité et de résistance (Andre, Berrada et al. 2010). Il pourra donc être vraiment très intéressant de réaliser des sélections pour découvrir de possibles marqueurs spécifiques d'un stroma soutenant une tumeur. La récupération spécifique de stroma, avant ou après sélection, peut être effectuée par microdissection (Sun, Shukla et al. 2009), une technique permettant de récupérer uniquement le tissu désiré sur une lame histologique de tissu.

Pour répondre aux carences actuelles limitant le diagnostic du cancer du sein, que ce soit en termes de disponibilité et d'utilisation des anticorps, mais également en termes de découverte de nouvelles cibles, nous avons donc mis au point plusieurs systèmes efficaces. La fonctionnalisation site spécifique des anticorps simple domaine permet de les utiliser très simplement comme outil universel, que ce soit comme agent de capture ou molécule de détection. Pour la découverte de nouvelles cibles, la stratégie mise au point de sélection masquée ouvre de grandes portes en termes d'isolement d'anticorps spécifiques d'un échantillon tumoral. Tous ces anticorps pourront ensuite être utilisés dans des champs d'applications extrêmement larges, que ce soit pour du diagnostic, de la thérapie, mais également de la recherche fondamentale.

Annexe

Review

State of the Art in Tumor Antigen and Biomarker Discovery

Klervi Even-Desrumeaux, Daniel Baty and Patrick Chames *

INSERM U624, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France;

E-Mails: klervi.even@inserm.fr (K.E.-D.); daniel.baty@inserm.fr (D.B.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: patrick.chames@inserm.fr;
Tel.: +33-4-91828833; Fax: +33-4-91826083.

Received: 6 April 2011; in revised form: 24 May 2011 / Accepted: 27 May 2011 /

Published: 9 June 2011

Abstract: Our knowledge of tumor immunology has resulted in multiple approaches for the treatment of cancer. However, a gap between research of new tumors markers and development of immunotherapy has been established and very few markers exist that can be used for treatment. The challenge is now to discover new targets for active and passive immunotherapy. This review aims at describing recent advances in biomarkers and tumor antigen discovery in terms of antigen nature and localization, and is highlighting the most recent approaches used for their discovery including “omics” technology.

Keywords: tumor antigen; biomarkers; immunotherapy; cancer; proteomics

1. Introduction

Cancer remains the major devastating disease throughout the world. Cancers are responsible for over 6 million deaths per year worldwide with at least 10 million new cases annually. In developing countries, cancer is the second most common cause of death, comprising 23%–25% of total mortality. Current treatments include chemotherapy and radiotherapy but these are often characterized by a low efficiency and a high level of toxicity.

More targeted therapies are eagerly awaited. Among them, immunotherapies, including any approach aiming at triggering an immune response toward tumor cells, are being actively pursued. The immune system is trained at recognizing and destroying non-self, such as pathogens and transformed cells. However, the immune system is much more efficient at recognizing and attacking germs than cancer cells. In many cases, differences between normal and cancer cells remain subtle and the

immune system may not always recognize cancer cells as foreign. Moreover, cancer cells have evolved several strategies to dampen or evade immune responses, leading to cancer spread in the presence of a healthy, working immune system. To overcome this issue, researchers are studying several ways to help the immune system to recognize and destroy cancer cells. Two main types of immunotherapy can be distinguished [1]. Active immunotherapies aim at stimulating the patient's immune system to fight the disease. Passive immunotherapies do not rely on patient's bodies to initiate the immune response but rely on the use of man-made immune components, such as antibodies.

Monoclonal antibodies (mAbs) are the most common form of passive cancer immunotherapy [2]. Once antibodies are injected, they are retained at the tumor site because of their affinity for a tumor antigen. Their mode of action can be direct (for example via induction of apoptosis) or indirect, via the recruitment of effector cells or through the activation of the complement cascade leading to tumor cell lysis. These latter two modes of action are referred to as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC) and are mediated through the Fc portion of mAbs. In the case of soluble antigens, mAbs can sequester the target and avoid their interaction with their receptor. From 1980 to 2010, several hundreds of therapeutic mAb have been studied in clinical trials by commercial companies worldwide for a variety of cancer indications. To date, 11 anticancer mAb have been approved by the US FDA for marketing.

Active immunotherapies are mainly developed as cancer vaccines [3]. Unlike regular vaccines, most cancer vaccines are not designed to prevent diseases but rather aim at raising a specific immune response against existing tumor cells. Cancer vaccines may contain cancer cells, parts of cells, or pure antigens. Interestingly, because a successful immune response is generating memory cells capable of being rapidly activated to destroy the same kind of cells, cancer vaccines have the potential to prevent relapses. Cancer vaccines have been studied for several decades, but advances in this field have been slower than for other forms of immunotherapy. However, several experimental treatments are currently leading to encouraging results. And recently, a prostate cancer vaccine has been approved by the FDA to treat advanced prostate cancer [4,5].

The treatment of cancer remains a formidable challenge owing to factors such as difficulties in differentiating tumor cells from healthy cells to fight the disease without causing intolerable toxicity. Much has changed in the last years due to the significant progress in immunology, molecular biology and completion of human genome sequence. Substantial antigenic differences have been found between tumors and normal tissues. A milestone in tumor immunology was the cloning of tumor antigen MAGE-1 by Boon's team in 1991 [6], and subsequent characterization of the first HLA-restricted T cell defined antigenic epitope a year later [7]. Because tumor-specific antigens are exclusively expressed by cancer cells and are often critical for tumorigenicity, they are ideal targets for anti-cancer therapy. However, targeting tumor-specific antigens would require therapeutic strategies to be made to individual patients or small subgroups of patients. Thus, until now mainly tumor-associated shared antigens have been targeted by active and passive cancer immunotherapy. Identification of new tumor antigens may lead to the development of future antigen-specific immunotherapy to tumors. Interestingly, such tumor antigens are often released in the circulation and can be used as biomarkers. More generally, cancer biomarkers can be defined as markers produced either by the tumor itself or by other tissues, in response to the presence of cancer or other associated conditions, such as inflammation. Biomarkers might be DNA, mRNA, proteins, metabolites, or processes such as apoptosis, angiogenesis or proliferation.

Such biomarkers can be found in a variety of fluids, tissues and cell lines. They are commonly employed in clinical diagnosis. For example, they can be used to diagnose cancer in an early phase, to subtype within a disease category and to monitor patients for response to therapy. Over the past several decades, enormous efforts have been made to screen and characterize useful cancer biomarkers. Some important molecules including carcinoembryonic antigen (CEA), human epidermal growth factor receptor-2 (HER2/neu), prostate specific antigen (PSA), alpha-fetoprotein (AFP), cancer antigen or carbohydrate antigen (CA 125, CA 15-3 and CA 19-9), have been identified. Interestingly, several biomarkers including HER2, CEA, PSA, mucin-1 (MUC-1) are also used in immunotherapy as tumor antigens.

Immunotherapy has been studied for several decades and has led to several encouraging results. The discovery of new tumor antigens could help to expand these approaches to a wider variety of cancers. Moreover, it is also important to discover new markers for other clinical applications such as diagnosis and prognosis. This review aims at describing the state of the art on current tumor antigens used in immunotherapy, and highlights the recent advances in biomarker and tumor antigen discovery approaches.

2. Antigens Used in Immunotherapy

2.1. Tumor Antigens: Definition

Based on qualitative differences, tumor antigens are divided into two classes: Tumor-specific antigens (TSAs) that are caused by mutations and tumor-associated antigens (TAAs) that result from over- or aberrant expression of non-mutated proteins.

TAAs represent a group of normal non-mutant molecules that can be subdivided into four major categories according to expression pattern [8]: (1) Cancer-testis like antigens (CT antigens): CT antigens include MAGE-1 [6,9], MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, and CML66, and CML28 [10]. Cancer-testis antigens are expressed in a wide range of different cancers, but are generally not expressed in most other normal somatic tissues, except testis [11]. Since testis is an immune privileged site that does not express MHC class I or II molecules [12], these antigens can practically be regarded as tumor-specific and are highly desirable as targets for antigen-specific immunotherapy; (2) Differentiation antigens: Differentiation antigens are tyrosinase, TRP-1, TRP-2, gp100, MART-1, CD20, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and MC1R [13,14]. Since these differentiation antigens are expressed in differentiation stage-dependent and tissue-specific manners, immunotherapy based on these antigens may not cause any side-effects on the other tissues; (3) Oncofetal antigens: These antigens are found on embryonic and fetal tissues as well as certain cancers. This category includes CEA, α -fetoprotein, 5T4, onco-trophoblast, and solid tumor associated glycoprotein [8,15]; (4) Overexpressed antigens: These antigens are normal proteins whose expression is up-regulated in cancer cells. Examples include PSA, prostatic acid phosphatase (PAP), proteinase 3 (myeloblastin), WT-1, MUC-1, wild-type p53, Her2/Neu, G250, prostate specific membrane antigen (PSMA) and epidermal growth factor receptor (EGFR) [16-19]. Because of their expression in normal tissue, TAAs are more likely to have induced immunologic tolerance [20]. Self-reactive T cells are deleted or inactivated, and when not deleted, have a reduced capacity to recognize target antigens [21]. If a cancer vaccine does break tolerance to TAAs, destruction of normal tissues or even fatal autoimmune damage might result from the generation of self-reactive T cells [22,23].

The second group of antigens is TSAs. Cancer results from the accumulation of somatic mutations, and cancer cells contain a large number of mutant proteins [24] than can be recognized as TSAs in an individual patient. With the large number of mutations found in common human cancers [25,26], every human cancer cell should harbor at least few mutations that can be therapeutically exploited, if the corresponding peptide can be efficiently presented by HLA molecules. TSAs are ideal targets for cancer immunotherapy because they are exclusively expressed by cancer cells and not on non-malignant tissues, minimizing the risk of autoimmune destruction. During tumor development, the immune system can recognize these determinants as non-self and generate specific high-affinity antibodies and T cells against them. Advantages of tumor-specific antigens include immunogenicity, decreased risk of inducing autoimmunity, decreased risk of immune escape and immunodominance, which make tumor-specific antigens attractive targets for immunotherapy. However, unlike TAAs, TSAs are expressed only on individual patient's cancer cells or small subsets of tumors and thus require the development of personalized therapy. Examples of TSA include three Ki-RAS point mutations (single amino acid substitutions) that are found in about 95% of all patients with pancreatic cancer. Another example can be given with mutated p53. The pivotal role of p53 as a tumor suppressor is illustrated by the fact that this protein is found mutated in ~50% of human cancers. In most cases, mutations in p53 greatly increase the otherwise short half life of this protein and cause it to accumulate in tumor cells. The aberrant p53 expression in many malignancies offers an attractive opportunity for antigen-specific immunotherapy of cancer [27]. This is because the mutated p53 that is present in tumor cells may be considered "nonself" or tumor specific [28]. The tumor specific mutations present in the p53 protein may alter its antigenicity, if the mutations occur in a region of the protein that can be presented as an epitope to the T cell.

Over the last 10 years, the genetic origins of several TSAs have been identified but in each case the mutations identified were only found in one individual tumor but not in cancer cells from other patients [29,30]. However, once more cancers are analyzed, prominent target genes and mutation patterns will likely emerge. Improvements in "omics" technology and database information should soon make such individually tailored therapies a reality.

2.2. *Passive Immunotherapy*

Passive immunotherapies use immune system components such as mAbs to attack the disease [31]. Naked mAbs are currently the most commonly used mAbs. Although they all work by binding to specific antigens, they use various mode of action. Some naked mAbs bind cancer cells to act as a marker for the body's immune system to destroy them. Such approved antibodies include: Rituximab, Ofatumumab and Alemtuzumab (Table 1). The effects of other naked antibodies come from their ability to bind to some receptors or ligands, thereby blocking their interactions with their cognate ligand or receptor, and avoiding some signaling necessary to the proliferation of cancer cells. Examples of FDA-approved mAbs of this type include: Trastuzumab, Cetuximab, Panitumumab and Bevacizumab (Table 1). By contrast, conjugated mAbs are monoclonal antibodies that are linked to drugs, toxins, or radioactive substances. The mAbs are used as transporters to deliver these substances directly to cancer cells. Conjugated mAbs can be divided into groups depending on what they are linked to. MAbs linked to radioactive particles are referred to as radiolabeled, and therapy with this

type of antibody is known as radioimmunotherapy (RIT). Two radiolabeled antibodies have been approved to treat cancer: Ibritumomab tiuxetan and Tositumomab (Table 1). MAbs linked to chemotherapy drugs attached are often referred to as chemolabeled and mAbs linked to toxins are called immunotoxins. There are no chemolabeled or immunotoxins approved for cancer therapy so far.

Table 1. Monoclonal antibodies approved by Food and Drug Administration (US) or European Medical Agency (EU).

Product	Type	Target	Indications	Date of approved
Rituximab (Rituxan)	Chimeric	CD20	Non-Hodgkin's lymphoma	1997 (US) 1998 (EU)
Trastuzumab (Herceptin)	Humanized	HER2	Metastatic breast cancer	1998 (US) 2000 (EU)
Gentuzumab (Mylotarg)	Humanized, (coupled to calicheamicin)	CD33	Acute myeloid leukemia	2000 (US)
Alemtuzumab (Campath)	Humanized	CD52	Chronic lymphocytic leukemia	2001 (US) 2001 (EU)
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)	Chimeric (⁹⁰ Y radiolabelled)	CD20	Non-Hodgkin's lymphoma	2002 (US) 2004 (EU)
Tositumomab (Bexxar)	Murine (¹³¹ I radiolabelled)	CD20	Non-Hodgkin's lymphoma	2003 (US)
Cetuximab (Erbix)	Chimeric	EGFR	Metastatic colorectal cancer	2004 (EU)
Bevacizumab (Avastin)	Humanized	VEGF-A	Metastatic colorectal cancer	2004 (US) 2005 (EU)
Panitumumab (Vectibix)	Human	EGFR	Metastatic colorectal cancer	2006 (US) 2007 (EU)
Catumaxomab (Removab)	Hybrid rat and mouse (trifunctional bispecific)	EpCam	Malignant ascites	2009 (EU)
Ofatumumab (Arzerra)	Human	CD20	Chronic lymphocytic leukemia	2009 (US)

The efficacy of anti-cancer mAbs is critically dependent on the nature of the target. An ideal tumor cell surface target should be accessible, abundant, homogeneous and consistently present on the surface of cancer cells within a tumor [32]. Importantly, targets should not be expressed on normal cells, especially those that constitute vital organs, so that anti-cancer mAbs can discriminate between healthy and malignant cells. Ideally, targets should not be secreted in any form by the tumor cells into the circulation because anti-cancer mAbs might bind to the soluble circulating antigen rather than the antigen presented by tumor cells. If ADCC or CDC modes of action are desired, the antigen-mAb complex should not be rapidly internalized by the cell because the Fc portion cannot activate the immune system. By contrast, internalization is necessary for cytotoxic activity in the case of some immunotoxins. These targets must be capable of antibody mediated internalization, or have an

intrinsically high turnover rate. Candidate therapeutic mAbs currently investigated in clinical studies are targeting approximately 80 different antigens (Table 2) [33]. However, only 10 different antigens are currently being targeted by mAbs developed for cancer therapies: EpCAM, MUC1, EGFR, CD20, CEA, HER2, CD22, CD33, Lewis Y and PSMA. The small size of this set clearly highlights the necessity to discover new tumor targets.

Table 2. Main tumor antigens used in clinical studies using mAb therapy.

Target	Antigen class/description	Number of mAbs *
EpCam (Epithelial cell adhesion molecule)	Cellular adhesion	17
EGFR (Epidermal growth factor receptor)	Growth factor receptor	12
CD20	CA2+ channel	10
MUC1 (Mucin 1)	Mucin	10
HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2)	Growth factor co-receptor	9
CEA (Carcinoembryonic antigen)	Oncofetal glycoprotein, cellular adhesion	9
CD22 (Siglec-2)	Sialoadhesin, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectine	6
CD33 (Siglec-3)	Sialoadhesin, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectine	6
LEWIS Y	Carbohydrate	6
PSMA (Prostate-specific membrane antigen)	Glycoprotein with folate hydrolase and NAALADase activities	6
TAG-72 (Tumor-associated glycoprotein 72)	Mucin like glycoprotein	5
CD30 (TNFRSF1)	TNF receptor super family	4
CD19	B-lymphocyte antigen	3
CD44V6	Adhesion molecule	3
CD56 (NCAM)	Cellular adhesion	3
GD2 ganglioside	Glycosphingolipid	3
GD3 ganglioside	Glycosphingolipid	3
HLA-DR10 (Human leukocyte antigen-DR)	MHC class II receptor	3
IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor)	Tyrosine kinase receptor	3
TAL6 (Tumor-associated antigen L6)	Members of the transmembrane-4 superfamily	3
TRAILR2 (Tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor)	Member of the tumor necrosis factor family	3
VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2)	Angiogenic growth factor receptor	3
CD152 (CTLA4)	Negative regulator of T cell activation	2
Unknown		11

* mAbs in clinical studies between 1980 and 2005 [28].

2.3. Active Immunotherapy

During the last decades, various strategies have been proposed to overcome the poor immune response against TAAs, including cell-based vaccines, DNA- or RNA-based vaccines, protein or peptides based vaccines, and vector based vaccines [34]. The common rationale for all these modalities is the activation of antigen presenting cells (APCs) and the stimulation of an antigen-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) mediated immune response (Table 3).

Table 3. Overview of different vaccination strategies.

Vaccine Type	Name	Phase	Tumor	Antigen	References
Viral vectors	PSA-TRICOM	II	Prostate	PSA	[31-34]
	PANVAC-VF	III	Pancreatic	CEA, MUC1	[35-37]
	TG4010	II	Breast, prostate, lung	MUC1, IL2	[38-40]
Peptides	Provenge	III	Prostate	PAP	[1,2]
	Oncophage	III	Melanoma, Renal	HSPg96	[42,43]
	Stimuvax	II	Lung	Extracellular core peptide of MUC1	[41]
Tumor cells or tumor-cell lysates	OncoVAX	III	Colon	Irradiated tumor cells	[44]
	Renial	III	Renal	Lysate of autologous tumor cells	[44,45]
	GVAX	III	Prostate	Irradiated humn prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3	[35]
RNA	mRNA from Pca cell lines	II	Prostate	PSA	[57]

A first vaccination strategy relies on the use of vectors. Several vectors can be used to deliver recombinant genes (including genes expressing TAAs, costimulatory molecules, or cytokines) into APCs. Recombinant vector-based vaccines may induce the immune system to generate a response against the genes of interest that have been inserted into the vector. One advantage of using vectors as vehicles for TAAs is that this type of delivery of a recombinant protein is much more immunogenic than the administration of the protein with adjuvants [35]. Vectors used in cancer immunotherapy include viral, bacterial, and yeast vectors. Poxviral vectors are among the most heavily exploited in vaccine development. The large genome of poxviruses (approximately 130 kb for mammalian poxviruses and 300 kb for avian poxviruses) allows for insertion of more than 10 kb of foreign DNA. Moreover, gene products are usually expressed at high levels, resulting in a potent cellular immune response. Two vector vaccines are actually in clinical trials: PSA-TRICOM vaccine (prostate-specific antigen plus a TRIad of Costimulatory Molecules; PROSTVAC) [36-39] and PANVAC-VF, another poxviral-based vaccine that consists of a priming vaccination with recombinant vaccinia encoding CEA(6D), MUC1(L93), and TRICOM plus booster vaccinations with recombinant fowlpox expressing

the identical transgenes [40-42]. TG4010 is another vaccine. It incorporates the MUC1 antigen, which is overexpressed in the majority of cancers, into a non-propagative pox viral vector, MVA. A second gene, interleukin-2 is also incorporated into TG4010 as an immune stimulus. The vaccine has been tested in breast, kidney, prostate and lung cancers with encouraging results [43-45] (Table 3).

The second method relies on the use of proteins or peptides to stimulate a specific immune response against cancer and employs single agents or combinations of proteins, heat-shock proteins (HSPs), peptides and agonist peptides, antiidiotype antibodies, and fusion proteins. These protein- or epitope-based vaccines have two main advantages over the use of tumor cells or lysates: Production, storage, and distribution are faster and more cost-effective, and the identification and administration of TSAs is preferable since tumor-cell preparations mostly contain self-proteins with no therapeutic benefit and are potentially capable of generating an autoimmune response. On the other hand, this approach has certain drawbacks: Single protein or, especially, a single epitope are sometimes weakly immunogenic. Tumors can easily escape immune recognition through antigen mutation. Their use is HLA restricted (mainly for epitope-based vaccines) and limited to a subset of patients (usually HLA-A2+). They have a poor ability to induce balanced activation of CD4 and CD8 subsets, which is thought to be essential for effective antitumor immunity. The use of specific proteins or peptides as targets for immunotherapy clearly requires a careful choice of the targeted TSAs or TAAs and their epitopes, involving knowledge of their structural and functional characteristics. Single-peptide epitope composed of 8 to 10 amino acids are able to induce a CTL response by binding to MHC class I molecules expressed on APCs. Several antigen vaccines are actually in clinical trials (Table 3) [4,5,46-48]. Provenge (sipuleucel-T, Dendreon Corporation), recently approved by FDA, is an autologous cellular immunotherapy from T cells designed to stimulate T-cell immunity against prostatic acid phosphatase (PAP) [4,5] (Table 3). Stimuvax (BLP25 liposome vaccine, L-BLP25, Oncothyreon partnered with Merck KGaA) is a cancer vaccine designed to induce an immune response against the extracellular core peptide of MUC1, a type I membrane glycoprotein widely expressed on many tumors (*i.e.*, lung cancer, breast cancer, prostate cancer, and colorectal cancer) [46] (Table 3). To avoid the disadvantages of using short peptides, the concept of synthetic long peptides (SLP) has been developed as vaccines [49]. When injected, these SLPs are predominantly taken up by dendritic cells resulting in the presentation of both helper T-cell epitopes and CTL epitopes that are present in the SLP [50]. In a recent study, a p53-SLP vaccine was found capable of inducing p53-specific T-cell responses in patients treated for colorectal cancer [27].

The third strategy of vaccine is the use of tumor-cells or lysates [40,51,52]. Tumor-cell vaccines have at least three advantages over the single-target approaches in terms of eliciting an immune response: Different and unknown antigens can be targeted at the same time, the immune response is not HLA-restricted, the variety of both MHC class I and class II epitopes processed is likely to be able to stimulate both an innate (natural killer cells, macrophages, and eosinophils) and adaptive (CD8+ and CD4+ T cells) response. The first important distinction is between vaccines using autologous (patient-specific) or allogeneic (non patient-specific) tumor cells. Second, these cells may be unmodified, modified for expression of MHC, costimulatory molecules, or cytokines, or used in combination with adjuvants such as GM-CSF and Bacille Calmette-Guerin (BCG). Third, these cells can be used in the form of tumor-cell lysates [52]. In the past 20 years, several different vaccines derived from whole tumor cells or tumor-cell lysates have been evaluated in preclinical models and clinical trials. OncoVAX (Vaccinogen) is composed of autologous irradiated tumor cells, with or

without BCG as an adjuvant [52]. Reniale (LipoNova) is a vaccine based on a lysate of autologous tumor cells, preincubated with IFN- γ to increase the antigenicity of these cells, and tocopherol acetate to protect cell membranes during the incubation process [51,52] (Table 3).

The last strategy is DNA- or RNA-vaccines. In this case, cells are injected with DNA encoding protein antigens. DNA-based vaccines are a recently developed strategy that has proven capable of activating strong immunity against weak TAAs. Recently, several phase I/II clinical trials employing DNA-based vaccines targeting different TAAs (*i.e.*, PSA, PAP, gp100, CEA, hsp65) have been conducted in patients with prostate cancer, melanoma, colorectal cancer, and head and neck carcinomas [53-57]. The mRNA-based vaccine containing the mRNA-coding TAA is transfected into DCs and translated into proteins. After protein processing, the antigen can be loaded on MHC molecules for antigen presentation, thus activating an antigen-specific CTL response. Clinical trials have been performed employing mRNA transfected DCs or injecting mRNA directly into patients with prostate cancer, renal cancer, ovarian cancer, lung cancer, breast cancer, pediatric brain cancer, neuroblastoma, and melanoma [58-63]. A phase I clinical trial was performed using PSA-mRNA transfected DCs in patients with metastatic prostate cancer [64] (Table 3).

2.4. Glycoproteins: A New Avenue

Until recently, tumor-specific tumor antigens that have been identified in mouse and human are mutant peptide epitopes. In eukaryotic cells, 95% of all proteins are post-translationally modified and glycosylation is the most frequent post-translational modification found. It is estimated that 50%–80% of cellular proteins—Membrane, cytosolic and nuclear—are glycosylated [65]. Although the amino acid sequence of proteins predominantly determines their three-dimensional structure, the post-translational modifications of the proteins modulate their physical and chemical properties and thus their stability and molecular function. Since glycoproteins, carbohydrates and glycolipids are the most abundant structures present on the surface of eukaryotic and prokaryotic cells, they are the first structures encountered by the immune system. Initially, it was thought that only pure protein epitopes could be presented on MHC and induces T cell responses. This was due in part to the observation that immunization with carbohydrate antigens usually resulted in low-affinity IgM responses without memory. To obtain a strong immune response, as reflected by IgG production, both T and B cells are required. However, recent publications have demonstrated that non-peptide molecules such as pure carbohydrates, glycopeptides and glycolipids can be presented on MHC molecules and recognized by T cells [66-73]. Although pure peptide epitopes are still considered as the primary targets for T cell responses, there is agreement that glycopeptides also induce T cell responses [68,70,72,73]. Therefore, the peptide epitopes that have been identified thus far as tumor epitopes might represent only a small fraction of potential targets. There are two types of glycosylation, *N*- and *O*-glycosylation [74,75]. *N*-Glycosylation occurs at the amino acid asparagine (Asn). The consensus sequence for *N*-glycosylation is the presence of the amino acid sequence Asn-X-serine/threonine (*X* may be any amino acid except proline). *O*-Glycosylation occurs at serine (Ser) or threonine (Thr) residues, but despite much effort, no consensus sequence for *O*-glycosylation has been identified. Aberrant glycosylation has been recognized for more than 30 years as a typical feature of cancer [74-80]. Changes in cell surface carbohydrate structures occur during tumor progression, invasion and

metastasis [81]. Cancer cells frequently display glycoproteins with increased branching of the glycan structures and/or altered expression levels compared with normal cells [82]. Such aberrations occur in both *N*- and *O*-linked glycosylation. Due to their wide expression profile in several malignancies, much effort has gone into targeting tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs) with active and passive immunotherapy and trying to augment their antigenicity and immunogenicity [83-85]. In addition to TACAs, gangliosides (GD3, GD2 and GM2) have also emerged as promising mAb targets for various cancers such as melanoma and neuroblastoma [78,86]. Intriguingly, many of the oldest and most widely used clinical cancer biomarker tests detect glycoproteins. These include CEA, commonly used as a marker of colorectal cancer, CA 125, frequently used to diagnose ovarian cancer and PSA for prostate cancer [87-93].

2.5. Intact Intracellular Proteins as Tumor Antigens: The Intrabody Concept

An intrabody (for intracellular antibody) is an antibody that has been designed to be expressed intracellularly, opening the possibility to specifically block a precise interaction of an antigen into the intracellular compartments of living cells. Intrabodies can be directed to a specific target antigen present in various subcellular locations including the cytosol, nucleus, endoplasmic reticulum (ER), mitochondria and trans-Golgi network (TGN). Combining specificity and antigen-binding affinity, intrabodies have been used as a biotechnological tool to interrupt, modulate, or define the functions of a wide range of target antigens at the posttranslational level. These intracellular antibodies are being developed to bind to, neutralize, or modify the function or localization of cancer-related targets and thereby affect the malignant phenotype.

There are many ways in which intrabodies could be used inside the cell to affect protein function [94,95]. Apart from blocking protein-protein or protein-nucleic acid interactions [96], it is possible to design intrabodies that bind antigen and relocate it to an inappropriate subcellular location. Intrabodies can also be employed to inhibit directly the function of an enzyme [97-99], or even to promote the death of target cells (e.g., cancer cells) by inducing caspase-3-mediated apoptosis [100]. In the field of cancer, intrabodies have been used to modulate the expression of proteins upregulated in tumors, such as erbB-2, interleukin-2 receptor, cyclin E (cell cycle protein), and EGFR [100-109]. In all these cases, appropriate cellular localization signals were fused to the intrabodies to reduce the activity of tumor-related proteins by altering their location. Oncogenic proteins, such as tumor protein 53 (p53) and proto-oncogen (RAS) [110], which are mutated in a large number of tumors are good candidates for intrabody therapy because they are tumor-specific therapeutic targets. A major challenge for the successful application of intrabodies for therapy is achieving sufficient internalization or expression inside target cells. Introducing intrabodies *in vitro* into cell lines in tissue can be achieved via gene expression using standard methods or by use of protein transduction domains linked to intrabodies [111]. Intrabody delivery *in vivo* represents another level of difficulty. Virally mediated gene transfer is a good option or an alternative approach would be to use immunoliposomes [112-114].

2.6. Biomarkers

A biomarker, according to the US national Cancer Institute, is a biological molecule found in blood, another body fluid or in tissues that is a sign of a normal or abnormal process. Generally, biomarkers

are produced by either the tumor itself or other tissues, in response to the presence of cancer or other associated conditions. Historically, cancer protein biomarkers have been discovered in body fluids and tumor tissues (or cell lines) using two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) separations or by identifying immunogenic antigens on cancer cells [115]. Conventional approaches have successfully produced FDA-approved blood-based cancer biomarkers and most of which are used to monitor treatment [116] (Table 4). Tumor markers can be used for screening of a general population, for differential diagnosis in symptomatic patients, and for clinical staging of cancer. A number of different types and forms of tumor markers exist. These markers include hormones, as well as different functional subgroups of proteins such as enzymes, glycoproteins, oncofetal antigens and receptors.

Importantly, a number of biomarkers used in diagnosis are also tumor antigens used in cancer therapies. Relevant examples include CEA, HER2 and MUC-1 [117-19] (Table 4). These molecules are membrane proteins targeted use in immunotherapy. However, the extracellular domain of these proteins is shed into the bloodstream and can be detected in serum. Consequently, the discovery of new biomarkers for diagnostic purposes might also in some case be of high interest for the discovery of new tumor target for therapeutic approaches.

Table 4. Main cancer biomarkers and their applications.

Biomarker	Cancer type	Clinical use in diagnosis	Clinical use in therapy
CEA	Colon	Monitoring	Passive and active therapy
Alpha-fetoprotein	Germ-cell hepatoma	Staging	<i>not used</i>
CA125	Ovarian	Monitoring	Passive therapy
EGFR	Colon	Prognosis	Passive therapy
KIT	Gastrointestinal	Diagnosis	Molecular therapy (Imatinib)
Thyroglobulin	Thyroid	Monitoring	<i>not used</i>
PSA	Prostate	Screening and monitoring	Passive and active therapy
CA15-3	Breast	Monitoring	<i>not used</i>
CA27-29	Breast	Monitoring	<i>not used</i>
Cytokeratins	Breast	Prognosis	<i>not used</i>
Oestrogen and progesterone receptor	Breast	Prognosis	Hormonotherapy
HER2	Breast	Monitoring	Passive and active therapy
Fibrin/FDP	Bladder	Monitoring	<i>not used</i>
Mucin 1	Glandular epithelial origin	Diagnosis, monitoring	Passive and active therapy
CA19-3	Pancreatic	Monitoring	<i>not used</i>

3. Strategies of Discovery of New T-cell Antigen and Biomarkers

Cancer is a complex disease that reflects genetic, as well as protein changes within a cell. During the past two decades, there has been a growing interest in approaches for discovering new biomarkers that may allow identification of potential targets for drug therapy. New biomarkers are urgently needed to accelerate efforts in developing new drugs and treatments of diseases. The explosion of high-throughput technologies available for generating large-scale molecular-level measurements in human populations has led to an increased interest in the discovery and validation of molecular biomarkers in medical research. Most biomarkers and tumoral antigen are not satisfactory because of their limited specificity and/or sensitivity. So, there is an urgent need to discover better targets in clinical practice. Global gene expression analysis has been extensively utilized, and the cancer management results are currently being translated into clinical tests, such as MammaPrint [120] and Oncotype DX [121] used for breast cancer. But gene expression data gives limited information since proteins are the main functional units performing all biological process in the cell or organism and may have post-transcriptional event(s) and post-translational modification(s) that contribute to the biological activity of proteins. The direct analysis of protein, the functional unit of the cell, using proteomics analysis has several advantages despite requiring more tissue and being more time-consuming. Several proteomics technologies including 2D-PAGE [122-124], surface enhanced laser desorption/ionisation time of flight (SELDI-ToF) [125], protein arrays [126,127], isotope coded affinity tags (ICAT), iTRAQ and multidimensional protein identification technology (MudPIT) are the approaches being implemented in cancer research (Table 5). 2D-PAGE and SELDI-ToF are the main technologies used in serum cancer research. However other technologies such as protein arrays, ICAT, iTRAQ and MudPIT also offer great potential for future biomarker discovery in cancer.

3.1. T-cell Antigens

One of the major contributions that proteomics has made to the medical and pharmaceutical community is the identification of potential drug targets. The identification and molecular characterization of self antigens expressed by human malignancies that are capable of elicitation of anti-tumor immune responses in patients has been an active field in tumor immunology. Much has changed in the last twenty years due to the significant progress in immunology, molecular biology and completion of human genome sequencing [128-130]. Substantial antigenic differences have been found between tumors and normal tissues. A great deal of evidence in mice and men has demonstrated that the host generates antibodies and T cells against developing tumors. Strategies have been developed to use patient's T cells (CD4+ and CD8+) and IgGs for the identification and characterization of tumor antigens.

Table 5. Methods for protein expression studies.

Methods	Number of proteins	Advantages	Disadvantages
ELISA	One	Well established, sensitive, specific, wide applicability	Separate assay for each protein
Western blotting	One	Wide applicability	Poor reproducibility
2D-Gel electrophoresis	Few thousand	Small costs, possibility of screening	Time-consuming
IHC	One	Determination of protein localization	Separate assay for each protein
TMA	One	Analysis of multiple samples	Problem of small tissue spot
Planar antibody array	Few hundred	Small sample volume, multiplexing capabilities, sensitive	Poor reproducibility, cross reactivity, labeling
RPPA	Few thousand	Small sample volume, multiplexing capabilities	Cross reactivity
Bead array	10–20 (max 100)	Multiplexing, small sample volume, wide applicability	Cross reactivity
MALDI-SM	Few thousand	Small sample volume, wide applicability, screening	Poor reproducibility, time-consuming
SELDI-SM	Few thousand	Small sample volume, screening	Low sensitivity, time-consuming
SPR	One	High sensitivity, small sample volume, no labeling	No screening, time-consuming
ICAT	Few thousand	Protein quantification of low abundant proteins	Only cysteine containing peptides can be analyzed (90%)
iTRAQ	Few thousand	Protein quantification	Lengthy sample processing separately
MudPIT	Few thousand	Protein identification and quantification, no labeling	No quantitative analysis

Three methods have been developed to define T cell tumor antigens. First method is T cell epitope cloning. cDNA libraries generated from tumor cells are transfected into target cells expressing the appropriate MHC Class I or II molecules, and anti-tumor T cells are used to identify the appropriate transfectant [6,9,131-134]. This method is a labor-intensive process and requires T cell culture and cloning expertise. Second is HLA-binding peptide elution. Peptides are eluted from the surface of cancer cells (or from MHC Class I or II molecules purified from cancer cells), pulsed onto APC and tested for reactivity with the patient's lymphocytes. Purification and sequencing of these peptides identifies the parental protein [135-137]. This method requires protein chemistry expertise in peptide purification and high power mass spectrometry. A third approach consists in identifying a subcellular compartment containing the CD4+ T cell-stimulatory activity, followed by separation of the stimulatory protein fraction by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The resulted fractions are then subjected by gel electrophoresis. The stimulatory band, identified by T-cell Western blotting, is finally subjected to protein sequencing [138].

A fourth method is to identify TAAs recognized by the antibody repertoire of cancer patients. These TAAs are overexpressed in patients and found at the surface of cells in peptide-MHC complex. TAAs identified with this method could be used for vaccination. In 1995, Pfreundschuh's team developed

this method of serological cloning approach called SEREX [129,139-141], which allows a systemic and unbiased search for antibody responses against protein antigens expressed by human tumors. The development of SEREX offered a high-throughput approach to analyze the humoral response against TAAs in cancer patients. This has allowed the direct molecular identification of antigenic tumor proteins. The respective tumor antigens in the recombinant cDNA libraries are identified from their reactivity with antibodies in the autologous and allogeneic sera of cancer patients. The advantages of SEREX include rapid identification of multiple tumor antigens and no need for establishment of tumor cell lines and pre-established CTL clones [129]. SEREX remains the prominent technology for identifying TAAs that could be used for immunotherapy [142] or diagnosis and prognosis [143].

3.2. Biomarkers

3.2.1. Sample choice and preparation

Blood is the most commonly used biological fluid for biomarker analysis in clinical practice. The advantages of using blood, serum and plasma as a source to mine for biomarkers include that it can be obtained through a minimally invasive procedure, it is abundantly available and some constituents of blood reflect diverse pathological states. It is known that plasma proteins range in concentration over 12 orders of magnitude and that 99% of the protein mass is comprised of only 22 proteins. For example, the most abundant plasma protein is albumin, which is present in plasma at a concentration of ~50 mg per milliliter. In contrast, known cancer derived proteins in the circulation are present at a few nanograms per milliliter, 10 million times less abundant than albumin. This large dynamic range of analytes in blood is a major disadvantage for using this source for biomarker discovery. The removal of predominant proteins facilitates better detection of less abundant proteins, but such depletion can lead to the loss of informative molecules. Without fractionation, the complexity of serum and plasma is a limitation, and important biological information can be lost in the background noise [144]. Early experiments in proteomics profiling of serum and plasma made evident that there is no technology platform that can analyze proteins quantitatively with a dynamic range of concentration as high as 10^{12} [145] and that pre-fractionation of these samples is necessary [146,147]. Currently, the major objective of clinical proteomics utilizing body fluids is to reduce the dynamic range of proteins in analyzed samples [145,147]. Initially, columns and cartridges for albumin and IgG were available [148,149] and were soon followed by columns for multiple protein removal, based on immunodepletion [150]. In a relatively short period, removal of most abundant proteins from serum/plasma became a standard first step in clinical proteomics analyses aiming at biomarker discovery [151]. This widely-used approach is now commonly accepted as the first step in sample preparation and it is quite obvious that immunodepletion of the 12 most abundant proteins is necessary (*i.e.*, albumin, IgG, fibrinogen, transferrin, IgA, IgM, haptoglobin, apo A-I, apo A-II, α 1-antitrypsin, α 1-acid glycoprotein, α 2-macroglobulin). These proteins comprise over 96% of total protein content in plasma/serum [145]. However, immunodepletion of multiple proteins can increase the risk of losing proteins of interest or low abundant candidate biomarkers that are removed along with those specifically depleted. Sample preparation remains one of the most time consuming and error prone aspects of analytical chemistry.

Another source of sample is surgically-removed or biopsy-obtained tissues. They are currently being considered as alternative sources for biomarker discovery. One of the major advantages of using tissues is that the concentration of candidate biomarkers should be highest in tumor tissues and they should be a rich source for plasma biomarkers. Under this strategy, candidate biomarkers are first discovered in tumors and then subsequently measured out in the plasma using highly sensitive, targeted assay technologies. Tissues can be difficult to obtain in sufficient quantities, especially normal counterparts for comparative analyses. Alternatively, cancer cell lines can be analyzed. They are easy to handle and comprise a homogeneous and almost inexhaustible source of biological material, including proteins. However, each cell line represents only one tumor unaffected by signals from the microenvironment, and the cells may have been subjected to clonal drift and *in vitro* selection, which may render them less representative of the tumor from which they originated [152-154].

Plasma membrane proteins that are exposed on the cell surface have important biological functions, such as signaling into and out of the cells, ion transport, and cell-cell and cell-matrix interactions. The expression level of many of the plasma membrane proteins involved in these key functions is altered on cancer cells, and these proteins may also be subject to post-translational modification, such as altered phosphorylation and glycosylation. Additional protein alterations on cancer cells confer metastatic capacities, and some of these cell surface proteins have already been successfully targeted by protein drugs, such as mAbs. Because plasma membrane proteins are low-abundant proteins compared with many soluble proteins, the overall fraction of plasma membrane proteins in a cell/tissue lysate is very low, making them difficult to study, even with the recent advances in proteomics technologies [155-157]. The combination of novel analytical approaches and subcellular fractionation procedures has made it possible to study the plasma membrane proteome in more detail, which will elucidate cancer biology, particularly metastasis [158,159], and guide future development of novel drug targets.

There are different strategies of sample preparation based on depletion of highly abundant proteins or on sample fractionation. (1) Centrifugal ultrafiltration is a variation of membrane filtration in which centrifugation forces a liquid against a semi-permeable membrane. Suspended solids and solutes of high molecular weight are retained, while the liquid and low molecular weight solutes pass through the membrane depending on the molecular weight cut off of the membrane used [160,161]; (2) Solid phase extraction (SPE) is a separation technique that uses a solid phase to isolate one, or one type, of analyte from a solution. SPE is commonly used in serum/plasma samples as a clean-up step to remove highly abundant proteins. Solid phase extraction columns are probably the approach most widely used for depletion of high abundance proteins in serum/plasma. Different types of SPE columns based on ion-exchange [162-164], metal chelating, affinity ligands [165], dye-ligands [166-168], bacterial proteins [169,170], antibodies [165,171] or combinations of these have been used. Surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) is an affinity-based mass spectrometric method that combines sample fractionation with mass spectrometry (MS) analysis. In recent decades, magnetic beads have emerged as a promising new platform in biomedical applications, particularly bioseparations [172]. Functionalized magnetic beads are used for solid phase extraction of a specific subset of molecules from a liquid. The nature of the molecules retained depends directly on the kind of surface-derivatized beads used; (3) The third method is organic solvent extraction. The possibility of selectively removing large abundant proteins from serum by precipitating them with simultaneous extraction of peptides and

low molecular weight proteins using organic solvents has been tested [173]. The precipitation with organic solvents in the presence of ion-pairing agents dissociates peptides and smaller proteins from large abundant proteins, thereby facilitating their extraction. Other strategies consist of sample fractionation before analysis by MS such as electrophoresis and chromatographic processes could be considered as sample preparation but also analysis strategies. These methods will be described later in the review. For enrichment of plasma membrane proteins, most strategies used either homogenization followed by membrane density separation or whole cell protein tagging followed by affinity purification. Enrichment of plasma membrane proteins using whole cell protein tagging is often based on a membrane-impermeable biotin labeling reagent followed by cell lysis and affinity purification using streptavidin-coated beads [174-176].

3.2.2. Gene expression profiling

In the late 1990s, DNA microarray technology emerged as a powerful tool for the analysis of the levels of mRNA transcripts expressed under various conditions. For example, microarray technology has been used to compare gene expression profiles in ovarian cancers and normal ovaries. The aim is to identify genes that are differentially expressed between the two states, with the expectation that similar patterns could be seen for the respective proteins in serum [177]. Several studies have attempted to identify new molecular biomarkers for the early detection of ovarian cancer by gene expression profiling [178-180]. The advantages of this approach include high throughput and objective molecular subclassification. Gene expression levels reflect the cumulative effect of several underlying biological functions as DNA-microarray technology has enabled the simultaneous examination of thousands of genes, in contrast to studying the expression of single genes. Current microarray platforms are highly automated and enable parallel sample analysis. Although information on mRNA expression levels and the corresponding protein abundances (or activities) are undoubtedly useful in genomic analyses, their values do not always correlate. Furthermore, the analysis of mRNA transcripts does not provide information regarding post-translational modifications (e.g., proteolysis, phosphorylation, glycosylation, acetylation, and deamination) of target proteins. Thus, alternative analytical methods are necessary for extended proteome studies.

3.2.3. Mass spectrometry

For protein quantification, the most commonly used method has been the ELISA [181] (Table 5). Due to its sensitivity and reliability, this method is widely used both in biomedical research and clinical diagnostics of proteins. Another important method, immunohistochemistry (IHC) is capable of localizing proteins of interest within a cell or tissue utilizing specific visualization techniques, such as fluorescently labeled antibodies [182]. However, this method is not able to quantify the exact amount of the proteins, but multispectral imaging does allow the examination of different proteins in a single measurement. However, these procedures are not applicable for target discovery principally due to the low throughput of the methods and the necessity of large volume of sample (Table 5). For this reason, MS-based protein identification combined with quantitative measurements is at the center of development of new technologies and methods. In MS, proteins are digested to predictable peptide fragments using proteases such as trypsin. Tryptic digests of biological proteomes (e.g., tissue or

plasma-derived proteins) can be analyzed using different modes of MS, depending on the desired application. For example, untargeted modes of mass spectrometry are used for *de novo* discovery of biomarker candidates such as from tumor tissues or proximal fluids. In contrast, targeted modes of mass spectrometry allow us to look for peptides (and so proteins) of interest in clinical specimens (SILAC, iTRAQ, ICAT, see later in this review). These modes of mass spectrometry can be very useful for determining whether biomarker candidates discovered in tissues or proximal fluids are present (and elevated) in plasma from cancer patients compared to controls. Moreover, all these techniques appear to be complementary and not exclusive. Mass spectrometers consist of an ionization source, a mass analyzer, and a detector. Although there are a variety of ionization sources (e.g., electrospray and matrix assisted laser desorption ionization) and mass analyzers, all MS instruments have these basic features in common. In a typical analysis of a biological sample, proteins or peptides are introduced into the ionization source where they are converted to gas-phase charged particles (ionized) and passed to the mass analyzer. In the mass analyzer, the ions are separated (using electric and magnetic fields) based on their mass-to-charge (m/z) ratios. The detector electrically detects the beam of ions passing through the machine (*i.e.*, the ion current) and amplifies the signal, which is recorded in the form of a mass spectrum. The fragmentation pattern is compared to the theoretical fragmentation pattern for every peptide in the genome to find the closest match. In this way the sequence of the peptide ion is inferred from its fragmentation pattern.

3.2.3.1. Two-dimensional electrophoresis

Electrophoresis is the movement of charged particles through a medium by using an electric field induced by electrodes. In proteomics, electrophoresis, especially gel electrophoresis, is still the most used separation technique for complex protein mixtures. Gel electrophoresis refers to the technique in which molecules are forced across a span of gel motivated by an electrical current. Activated electrodes at either end of the gel provide the driving force. The properties of the molecules, such as size, electric charge, structure, *etc.* determine how rapidly an electric field can move them through the gel. 2D-PAGE is widely used in proteomic studies due to its separation power. Proteins are initially separated according to their isoelectric point (pI) by isoelectric focusing (IEF) in the first dimension, followed by separation in the second dimension according to their molecular weight. The result is an array of spots detected by different staining procedures [183]. Up until now 2D-PAGE has been primarily utilized to analyze complex protein mixtures in most laboratories [122,123]. This method allows comparative studies of different samples, such as normal *versus* diseased, or treated *versus* untreated, in order to determine expressional differences at the individual protein or protein group level, assumed to be responsible for phenotype changes (Table 5). 2D-PAGE is the most widely used proteomics technique to study the proteome as well as cancer biomarkers [184-188]. In a proteomics study of breast cancer serum, two proteins, hsp27 (up-regulated) and 14-3-3 sigma (downregulated) were identified using 2D-PAGE coupled with MALDI-TOF-MS [189]. Another example is identification of potential serum markers in pancreatic cancer. Serum samples from 3 pancreatic cancer patients and 3 normal and healthy individuals were analyzed using two dimensional differential gel electrophoresis (DIGE) coupled with MALDI/TOF/TOF-MS and 24 unique up-regulated proteins and 17 unique downregulated proteins were identified in cancer serum [188]. To identify the proteins of

interest, other downstream processes such as Western blotting and/or MS is applied. The resolution of this method is sufficient to separate protein isoforms modified by post-translational processes. However, this approach has several limitations: (a) Difficulty with automation; (b) Poor detection of low-abundance proteins; (c) Difficulty in separating hydrophobic membrane proteins, and basic and high molecular mass proteins; (d) Poor reproducibility; and (e) Time-consuming protocols. Modified 2D electrophoresis by fluorescent tagging of proteins (DIGE), offers increased throughput, ease of use, reproducibility, and accurate quantitation of protein expression differences [190]. This system enables the separation of two or three fluorescently labeled protein samples (Cy2, Cy3 and Cy5) on the same gel.

3.2.3.2. Chromatographic processes

Chromatographic processes can be defined as separation techniques involving mass-transfer between stationary and mobile phases. Liquid chromatography (LC) is the most widely used mode of analytical chromatography and uses a liquid mobile phase to separate the components of a mixture. These components (or analytes) are present in a liquid phase or dissolved in a solvent, and then forced to flow through a chromatographic column usually under high pressure (HPLC). In the column, the mixture is resolved into its components. As a result, LC acquires a high degree of versatility not found in other chromatographic systems and it has the ability to easily separate a wide variety of chemical mixtures. Application of LC–MS to biomarker discovery is not yet very widespread partly because the method generates large and highly complex data sets that require powerful algorithms and software tools to handle and analyze them.

3.2.3.3. SELDI-TOF MS

SELDI-TOF MS, introduced in 1998 by Ciphergen [191] is an innovative microarray approach, and offers on-chip purification of unlabeled target proteins followed by subsequent ionization and MS detection of the retained molecules [192]. This technique allows proteins/peptides to be profiled from different biological samples on a variety of chemically (e.g., anionic, cationic, hydrophobic, hydrophilic, metal affinity capture) or biochemically (e.g., immobilized antibody, receptor, DNA, enzyme) defined chromatographic surfaces (Table 5). A small amount of sample of interest is loaded onto ProteinChip™ arrays that selectively bind different subsets of proteins in crude samples by adsorption, partition, electrostatic interaction or affinity chromatography according to their surface chemistries. After a short incubation period, unbound proteins and unspecific substances are washed away with an appropriate buffer and water. The ToF reader records the time-of-flight and calculates the accurate molecular weight of proteins/peptides in the form of a spectral map containing mass to charge ratios (m/z) and intensities corresponding to each bound protein/peptide. For example, applications of SELDI-ToF have been demonstrated for the early detection of prostate [193,194], breast [195,196] and pancreatic [197] cancer biomarkers. SELDI was also used in the discovery and detection of a number of cancer-associated biomarkers, including those for ovarian cancer [198], prostate cancer [199] and breast cancer [200]. However, there is some controversy over this technology such as its reproducibility, the bioinformatics used, the possibility of over-fitting, the potential bias in the samples, as well as how this could possibly fit into a routine diagnostic lab [201,202].

3.2.3.4. Laser capture microdissection

Analysis of human tissue is essential for translational research because cell cultures and even animal carcinogenesis models may not accurately represent the complexities of human disease states [203]. Laser capture microdissection allows scientists to procure pure cell populations from heterogeneous tissue sections [204,205]. Protein or DNA/RNA may be analyzed from the microdissected cells, lending this technology to comprehensive molecular profiling of tissues.

Laser-capture microdissection, described by Emmert-Buck *et al.* in 1996 brings molecular analysis to the cellular level [204]. This technique allows for precise collection of pure cell populations. Studies have confirmed that microdissection increases the specificity of signals obtained in downstream protein analysis [206-209]. Laser-capture microdissection is particularly vital in the molecular profiling of normal and malignant tissue because of its utility in obtaining pure cell populations.

3.2.3.5. Proteins quantification

Because most disease associated markers are not exclusively expressed in either the disease or the “healthy” state, quantification of protein expression differences must be included in marker identification strategies. The quantification strategies used in combination with MS based proteomics are often based on the introduction of stable isotopes into the samples, which can be done either by metabolic, chemical, or proteolytic labeling (Table 5).

SILAC: The most widely used metabolic labeling strategy is stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). SILAC is simple and powerful because the label is introduced prior to protein purification but can mainly be applied to cells in culture. Quantitative proteomics using chemical and proteolytic labels is, in contrast to SILAC, sensitive to variations in protein purifications between the compared samples because the labels are introduced after protein purification.

ICAT: Isotope-coded affinity tags (ICAT) use stable isotope labeling to perform quantitative analysis of paired protein samples. It consists of a reactive group, which reacts with cysteine residues, a linker containing the stable isotopes and a biotin tag for purification of labeled peptides [210]. Both samples are mixed, digested with trypsin, fractionated by avidin affinity chromatography and then these differentially tagged peptides are scanned in a mass spectrometer. Spectral peak analysis in single mass spectrometric (MS) mode of the isotopically resolved peptides from the two different sources enables quantitation of the relative amounts of the peptide and hence the protein levels. One weakness of ICAT is that only cysteine containing peptides can be labeled. Approximately 10% of proteins do not have cysteine, therefore they will not be detected by ICAT.

iTRAQ: In the iTRAQ system, the tags react with the N termini of the peptide and lysine residues, thus tagging all peptides [211]. iTRAQ contains a set of four isobaric reagents and therefore can analyze up to four protein samples at one time. After trypsin digestion, samples are labeled with four independent iTRAQ reagents and analyzed by MS. The intensity of each of these peaks represents the quantity of small reporter group fragments and thus represents the quantity of a peptide sample. Peaks in the spectrum graph are used to identify peptide sequences and therefore protein sequences. A comparative analysis of iTRAQ and ICAT suggests that the information generated by the two methods is complementary. ICAT is preferred for low abundant proteins including signaling molecules;

however, overlapping peaks in the MS spectrum can compromise the quality of results. On the other hand, apart from nonspecific nature of labeling, iTRAQ requires lengthy sample processing separately that increases the chances of experimental variation [212].

¹⁸O: Heavy oxygen (¹⁸O) can be introduced into peptides through proteolytic labeling by digesting the proteins in the presence of H₂¹⁸O using trypsin, Lys-C, or Glu-C, which introduces one or two ¹⁸O molecules into the peptides [213].

MudPIT: MudPIT is an approach that uses multidimensional high-pressure liquid chromatography separation, tandem mass spectrometry and database searching [214]. MudPIT permits a rapid and simultaneous separation and identification of proteins and peptides in a complex mixture without the need for pre- or post-separation labeling, which is not possible in ICAT or iTRAQ [215]. The complex protein mixture is digested with a specific protease, peptide fragments are separated in parallel by two dimensional liquid chromatography (strong cation exchange column and reverse phase column). Eluted peptides are identified by tandem mass spectrometry. The technique is extremely sensitive and reproducible. One of the major weaknesses of MudPIT is in identifying quantitative differences in protein expression across protein mixtures [216].

3.2.3.6. Immuno-enrichment

The most selective and sensitive methods for the enrichment of low abundant analytes in proteome analyses use highly selective capture molecules. Immunoprecipitation, co-immunoprecipitation or pull-down assays have been set up to enrich single proteins or protein complexes from highly complex samples followed by direct MS-based quantification or by proteolytic cleavage and identification of peptides via peptide mass fingerprint or MS/MS-based methods [217-220]. Other approaches use antibody phage display technology which is a strategy used to isolate tumor specific antibodies able to bind their cognate antigens in the cellular context for therapeutic uses [221-224]. For antibody phage display, antibody fragments are fused to the pIII minor capsid protein and displayed at the surface of filamentous phage M13. Repertoires of antibody variable (V) domains can be generated and used to construct large libraries of human scFv, Fab, or single domain antibody, which can then be used to generate panels of antibodies to virtually any antigen [225,226]. Direct selection of tumor specific antibodies from phage display human antibody libraries on tumor cells provides an approach for generating large panels of human antibodies that recognize tumor specific markers [225,227-231]. These tumor specific antibodies can be used to immunoprecipitate their tumor antigen for identification by MS, allowing a reduction of the sample complexity before MS based protein identification.

3.2.4. Protein array

In a basic sense, protein arrays consist of immobilized protein in a defined area. Protein microarrays were first described by MacBeath and Schreiber in 2000, and the number of publications involving this technology is rapidly increasing [232]. Miniaturized microspot assays are becoming increasingly popular for protein-protein interaction analysis and protein profiling. Each array spot contains homogeneous or heterogeneous capture agents such as antibodies [233-235], aptamers, recombinant proteins or peptides [232,236], cell or phage lysates [237], or drugs immobilized at high spatial density on a solid surface to selectively extract target proteins from complex mixtures, including serum and

cell lysate samples. They are the protein analog of cDNA arrays. However, they are technically more difficult to make because proteins are more complex in their composition, protein folding, denaturation, aggregation, and multimerization. Protein-detecting microarrays are typically used for two different types of analysis: (a) Determining the abundances of target proteins in a complex mixture through highly specific antigen-antibody interactions [238]; and (b) Providing information on the functions of target proteins through protein-protein interactions, receptor-ligand interactions, enzymatic activities, and other methods [239-245]. Protein arrays are being used for drug discovery, biomarker identification and molecular profiling of cellular material [236,246-248]. There are currently two classes of protein microarrays used in human sample research: Forward-phase protein microarrays (FPPAs) and reverse-phase protein microarrays (RPPAs) (Table 5).

FPPA: Forward-phase arrays use immobilized antibodies as bait to capture specific antigens within a heterogeneous mixture. As bait antibodies incubate with a test sample, antigens of interest become bound to their corresponding antibodies. The antigens of interest are then detected and visualized by a second “sandwich” antibody. The disadvantage of FPPAs is the requirement for 2 antibodies for the identification of any particular antigen. Therefore, the antigens of interest must be in conformational states allowing the binding of two distinct antibodies.

The most commonly used microchips are planar antibody microarrays, where well-characterized antibodies are immobilized to capture the proteins of interest. The wider application of protein arrays in biomedical research is still limited, partly because of the cost of producing and immobilizing antibodies and the limited availability of antibodies with high specificity and high affinity for their target. Recently, new strategies have been developed to solve these problems such as the use of very stable and available single domain antibodies (sdAb) [249]. Additionally, the difficulties associated with preserving proteins in their biologically active conformation before analysis with protein arrays further limits the application of this technology as a routine proteomic strategy. Nevertheless, protein-array platforms became an attractive profiling approach among many proteomics technologies [245,250-253] because of the promise of large scale analysis that can be performed with relatively low amount of sample, technical ease and high throughput [254,255]. Microbead-based protein arrays are based on the interaction between surface (polystyrene microspheres) attached capture molecules and proteins of cell lysates. The surface bound complexes on the microbeads are interrogated by flow cytometry. This technique is suitable to detect protein-protein, nucleic acid-protein, and nucleic acid-nucleic acid interactions. Multiplexing is achieved by either using different sized microbeads or color coding that is readable by a laser-induced fluorescent detection system [256]. This latter approach is suitable for the analysis of up to a hundred different bead-bound antibodies and/or proteins in a complex mixture.

RPPA: Reverse-phase protein microarrays have been introduced by Paweletz *et al.* in 1998 [257]. The name “reverse-phase” is used because cell lysates are immobilized in the solid phase and are probed with an antibody. An array can be composed of many patient samples in a dilution curve format that allow quantitation [258]. Moreover, multiple lysates representing normal invasive cell populations may be printed in parallel on the same array. There are many advantages of reverse-phase protein arrays to analyze cancer-related protein networks. First, RPPAs have higher throughput capabilities. Reverse-phase protein microarrays require low sample volume (approximately 2 nL per spot), enabling researchers to print hundreds of patient samples onto a single array slide. In addition,

the low volume requirement allows for analysis of often-limited patient biopsy material. The high-throughput nature of RPPAs is also necessary for the real-time analysis of patient tissue.

NAPPA: The next advancement in protein microarrays was development of high-density, self-assembling protein microarrays, based on the concept of the nucleic-acid programmable protein array (NAPPA) [251,252,254]. The concept is to synthesize proteins on the high-density chip using spotted cDNA and a T7-coupled rabbit reticulocyte lysate *in vitro* transcription-translation (IVTT) system [251]. Translated proteins contain a C-terminal glutathione S-transferase (GST) tag, which is used to capture co-printed anti-GST antibody. NAPPA represents a crucial step in addressing many of the concerns related to manufacturing limitations (e.g., density of printing, reproducibility, and quality of immobilized proteins).

To resume, microarrays are useful for high throughput analysis of candidate biomarkers in patient samples. However, the method has a limited role in discovery based identification of novel biomarkers where other platforms, such as MS, are better suited. Despite the technological advances, protein microarrays still suffer from skepticism and criticism. At present, protein arrays remain an emerging technology [259,260] that requires further technological developments and refinements but have great potential as complementary approaches to other profiling platforms.

3.2.5. Surface plasmon resonance

Surface plasmon resonance (SPR) is one of the most sophisticated methods used today to detect and quantify biomolecular interactions in real time in a nondestructive manner without any labeling requirement [261] (Table 5). Capture agents are immobilized on a gold surface, and the change in the reflection angle of light is used to quantify the number of unlabeled target molecules captured on the surface [262]. In conventional SPR systems, a single channel is available within a single experiment. Thus, miniaturization and parallelization of SPR apparatus have been elaborated to perform multiple measurements in a single experiment. Recently, a SPR imaging technique was developed to improve throughput in SPR-based detection of molecular interactions. For instance, the S-protein-S-peptide interaction was examined using an array composed of five different peptides, including S-peptide, by determining an association rate, a dissociation rate, and an equilibrium association constant [263]. SPR imaging methods can now monitor hundreds of biomolecular interactions in real time simultaneously, and are suitable for unqualitative screening and quantitative kinetics experiments [264]. The integration of SPR and MS has proven useful in the analysis of biomolecular interaction patterns, including drug candidates, enzyme inhibitors, DNA binding proteins, disease markers, peptide sequences, and post-translational modification [265-268].

3.2.6. Tissue microarray

Tissue microarray (TMA) technology was first described by Wan *et al.* in 1987 [269]. However, it was not until 10 years later, when Kononen *et al.* developed a device that could rapidly and reproducibly produce quality TMAs [240] that this technique emerged. The key benefit underlying TMA technology is the ability to assay hundreds of patient tissues arrayed on a single microscope slide. In its most common form, a core of tissue is lifted from a formalin-fixed, paraffin embedded sample and placed in a predrilled hole in a paraffin recipient block. On sectioning, each sample is

represented as a small (0.6- to 2-mm diameter) histologic section arrayed in a grid that allows easy linkage to clinicopathologic data. The result is a single slide that contains samples from 40 to 800 patients (depending on core size). Other researchers have adapted TMA technology to frozen tissues [270], cell lines [271,272], and needle biopsies [273]. TMA provide several benefits. Each TMA uses only a small core from the donor blocks, each block can be used in dozens (or potentially hundreds) of newly created TMAs. Second, TMAs can drive significant cost savings both in terms of reagents and technician time required to stain one slide instead of hundreds. Third, because of the inherent efficiency in processing hundreds to thousands of tumors at one time, TMAs can dramatically increase the number of tumors that can be analyzed compared with traditional whole-section studies. TMAs are arrayed on a single slide, all of the tumor specimens are stained consistently, at the same time, under the same conditions, and with exactly the same antibody dilution. However, because TMAs examine only a fraction of the tumor that is analyzed using traditional methods, many researchers were initially concerned that TMA cores would not adequately assess biomarkers that exhibited tissue heterogeneity. Subsequently, multiple groups have demonstrated strong correlations between TMA histospots and whole-tissue sections [274,275]. Although the size of TMA histospots presented challenges to assessing tumor heterogeneity, they also provided a new opportunity for developing automated methods of analysis. Indeed, histospots are sufficiently small to allow a rigorous molecular quantification. Because TMAs are prevalidated by a pathologist during construction, automated systems would only have to assess staining intensity. Automated analysis permits the quantification of biomarkers in a way that matches their biologic expression. The last 10 years have provided an opportunity to invent and refine new techniques in production, staining, and analysis that will help TMA technology with the big challenge of discovery of biomarkers. TMAs are ideally suited to rapidly triage hundreds or thousands of potential biomarkers, permitting researchers to focus on a few likely candidates [276]. It has become an attractive validation strategy and is also sometimes described as a proteomics technique. This type of validation of potential novel biomarkers, including PM proteins, relies on access to large numbers of biological samples, e.g., biopsies of primary tumors and metastases collected and stored for research at hospitals.

3.3. Glycosylated Proteins

Glycosylation is the most common, being present in ~50% of the total number of proteins [65]. Cancer cells frequently display glycoproteins with increased branching of the glycan structures and/or altered expression levels compared with normal cells [82]. An increase in the branching creates additional sites for terminal sialic acid residues, negatively charged acidic sugars that can be recognized by lectins [277]. The glycan structure or expression level of many PM glycoproteins may be altered, alterations may also occur on secreted glycoproteins and serve as biomarkers for early detection of cancers [82,278-280]. Tumor markers in current clinical use, such as carcinoembryonic antigen, prostate-specific antigen, HER-2, and mucins (e.g., CA 19.9, CA 125, and CA 15.3), are all glycoproteins that are either membrane-associated or secreted to the serum [280-282].

Glycoproteomics usually includes enzymatic digestion of the glycoprotein-containing samples to generate peptides and glycopeptides. The glycopeptides are then enriched using selective chromatographic methods, typically using immobilized lectins, hydrophilic interaction LC, titanium

dioxide, or graphite [283-291]. Lectins, e.g., concanavalin A, differ in their specificity and selectivity toward glycan compositions. The glycopeptides recovered by one or a combination of enrichment methods are then analyzed using MS, which can be used to obtain spectra of intact glycoproteins, glycopeptides, or released glycans [140,292]. The challenge with quantitative and qualitative analysis of glycopeptides is that it is not always possible to obtain glycopeptides with just one glycosylation site, and not all glycosylation sites are necessarily occupied by glycan moieties, whereas others may be partially occupied. Exploiting differences in glycosylation between malignant and healthy tissues likely affords excellent opportunities to identify sensitive and specific cancer biomarkers [92,284,293].

4. Conclusions

Application of genomic and proteomic technologies have led to the identification of many hundreds to thousands of biomarker candidates for several diseases. The identification and characterization of tumor specific markers remains a major goal in both understanding the cellular transformation observed in cancer and in developing targets for the molecular therapy of cancer. Molecules that are tumor-specific or overexpressed in cancer are likely to have functional roles that participate in cellular transformation and migration. Targeting of such molecules can result in an anti-tumor effect and therefore might be of interest for cancer therapy. Of particular interest within the spectrum of tumor-specific and overexpressed molecules are those located at the cell surface, since they are readily accessible and can be used to target cancer cells with highly specific ligands like mAbs. A difficulty of protein expression profiling arises from the unpredictable rate of protein degradation. Proteins act mostly as effector molecules with a short life time and their degradation is influenced by many parameters such as size, structure, composition, co- and post-translational modifications, *etc.* Changes can also be caused by an altered reaction environment such as pH, salt concentration, hydrophobicity, or by analysis-related artifacts that are generated during sample processing.

New challenges arise in large scale proteomic profiling when dealing with complex biological mixtures such as mammalian cell lysate. Identification of large numbers of proteins from complex biological samples is a continuing challenge in the area of quantitative proteomics. However, the sample complexity can be effectively reduced with corresponding increases in protein identification using various methods. In the near future, the refinement and possible combination of these emerging techniques will likely lead to the identification of a large panel of new biomarkers and tumor antigens. Hopefully these new markers will then be used to develop efficient diagnostic procedures and relevant immunotherapeutic approaches against a large variety of cancers.

Acknowledgements

This work was supported by CNRS, INSERM, the French National Research Agency (Agence Nationale de Recherche—ANR) program ‘Nanosciences and Nanotechnologies’ under the grant ANR-07-PNANO-051-01 and by the ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer).

References

1. Bergman, P.J. Cancer immunotherapy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2010**, *40*, 507-518.

2. Weiner, L.M.; Surana, R.; Wang, S. Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 317-327.
3. Vergati, M.; Intrivici, C.; Huen, N.Y.; Schlom, J.; Tsang, K.Y. Strategies for cancer vaccine development. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, doi:10.1155/2010/596432.
4. Higano, C.S.; Schellhammer, P.F.; Small, E.J.; Burch, P.A.; Nemunaitis, J.; Yuh, L.; Provost, N.; Frohlich, M.W. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* **2009**, *115*, 3670-3679.
5. Small, E.J.; Schellhammer, P.F.; Higano, C.S.; Redfern, C.H.; Nemunaitis, J.J.; Valone, F.H.; Verjee, S.S.; Jones, L.A.; Hershberg, R.M. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 3089-3094.
6. van der Bruggen, P.; Traversari, C.; Chomez, P.; Lurquin, C.; De Plaen, E.; Van den Eynde, B.; Knuth, A.; Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **1991**, *254*, 1643-1647.
7. Traversari, C.; van der Bruggen, P.; Luescher, I.F.; Lurquin, C.; Chomez, P.; Van Pel, A.; De Plaen, E.; Amar-Costesec, A.; Boon, T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* **1992**, *176*, 1453-1457.
8. Dermime, S.; Gilham, D.E.; Shaw, D.M.; Davidson, E.J.; Meziane el, K.; Armstrong, A.; Hawkins, R.E.; Stern, P.L. Vaccine and antibody-directed T cell tumour immunotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1704*, 11-35.
9. Boon, T.; van der Bruggen, P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 725-729.
10. Mathieu, M.G.; Miles, A.K.; Li, G.; McArdle, S.E.; Rees, R.C. Cancer/testis antigens for therapeutic use. *J. BUON* **2009**, *14* (Suppl. 1), S97-S102.
11. Chen, Y.T.; Old, L.J. Cancer-testis antigens: Targets for cancer immunotherapy. *Cancer J. Sci. Am.* **1999**, *5*, 16-17.
12. Fijak, M.; Meinhardt, A. The testis in immune privilege. *Immunol. Rev.* **2006**, *213*, 66-81.
13. Ribas, A.; Weber, J.S.; Chmielowski, B.; Comin-Anduix, B.; Lu, D.; Douek, M.; Ragavendra, N.; Raman, S.; Seja, E.; Rosario, D.; *et al.* Intra-lymph node prime-boost vaccination against melan A and tyrosinase for the treatment of metastatic melanoma: Results of a phase 1 clinical trial. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2987.
14. van Meerten, T.; Hagenbeek, A. CD20-targeted therapy: The next generation of antibodies. *Semin. Hematol.* **2010**, *47*, 199-210.
15. Elkord, E.; Burt, D.J.; Drijfhout, J.W.; Hawkins, R.E.; Stern, P.L. CD4+ T-cell recognition of human 5T4 oncofoetal antigen: Implications for initial depletion of CD25+ T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 833-847.
16. Carballido, E.; Fishman, M. Sipuleucel-T: Prototype for development of anti-tumor vaccines. *Curr. Oncol. Rep.* **2011**, *13*, 112-119.
17. Singh, R.; Bandyopadhyay, D. MUC1: A target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 481-486.

18. Ghosh, A.; Heston, W.D. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *91*, 528-539.
19. Correa, I.; Plunkett, T. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: HER2/neu peptides as tumour vaccines for T cell recognition. *Breast Cancer Res.* **2001**, *3*, 399-403.
20. Cloosen, S.; Arnold, J.; Thio, M.; Bos, G.M.; Kyewski, B.; Germeraad, W.T. Expression of tumor-associated differentiation antigens, MUC1 glycoforms and CEA, in human thymic epithelial cells: Implications for self-tolerance and tumor therapy. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 3919-3926.
21. Yu, Z.; Theoret, M.R.; Touloukian, C.E.; Surman, D.R.; Garman, S.C.; Feigenbaum, L.; Baxter, T.K.; Baker, B.M.; Restifo, N.P. Poor immunogenicity of a self/tumor antigen derives from peptide-MHC-I instability and is independent of tolerance. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 551-559.
22. Gilboa, E. The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 789-792.
23. Ludewig, B.; Ochsenbein, A.F.; Odermatt, B.; Paulin, D.; Hengartner, H.; Zinkernagel, R.M. Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 795-804.
24. Tomlinson, I.; Sasieni, P.; Bodmer, W. How many mutations in a cancer? *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 755-758.
25. Weir, B.A.; Woo, M.S.; Getz, G.; Perner, S.; Ding, L.; Beroukhi, R.; Lin, W.M.; Province, M.A.; Kraja, A.; Johnson, L.A.; *et al.* Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* **2007**, *450*, 893-898.
26. Wood, L.D.; Parsons, D.W.; Jones, S.; Lin, J.; Sjoblom, T.; Leary, R.J.; Shen, D.; Boca, S.M.; Barber, T.; Ptak, J.; *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **2007**, *318*, 1108-1113.
27. Speetjens, F.M.; Kuppen, P.J.; Welters, M.J.; Essahsah, F.; Voet van den Brink, A.M.; Lantrua, M.G.; Valentijn, A.R.; Oostendorp, J.; Fathors, L.M.; Nijman, H.W.; *et al.* Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 1086-1095.
28. Lauwen, M.M.; Zwaveling, S.; de Quartel, L.; Ferreira Mota, S.C.; Grashorn, J.A.; Melief, C.J.; van der Burg, S.H.; Offringa, R. Self-tolerance does not restrict the CD4+ T-helper response against the p53 tumor antigen. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 893-900.
29. Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* **1991**, *253*, 49-53.
30. Takenoyama, M.; Baurain, J.F.; Yasuda, M.; So, T.; Sugaya, M.; Hanagiri, T.; Sugio, K.; Yasumoto, K.; Boon, T.; Coulie, P.G. A point mutation in the NFYC gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human squamous cell lung carcinoma. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 1992-1997.
31. Chames, P.; Van Regenmortel, M.; Weiss, E.; Baty, D. Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 220-233.
32. Carter, P.; Smith, L.; Ryan, M. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, *11*, 659-687.
33. Reichert, J.M.; Valge-Archer, V.E. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 349-356.

34. Palena, C.; Abrams, S.I.; Schlom, J.; Hodge, J.W. Cancer vaccines: Preclinical studies and novel strategies. *Adv. Cancer Res.* **2006**, *95*, 115-145.
35. Kass, E.; Schlom, J.; Thompson, J.; Guadagni, F.; Graziano, P.; Greiner, J.W. Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 676-683.
36. Halabi, S.; Small, E.J.; Kantoff, P.W.; Kattan, M.W.; Kaplan, E.B.; Dawson, N.A.; Levine, E.G.; Blumenstein, B.A.; Vogelzang, N.J. Prognostic model for predicting survival in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 1232-1237.
37. Kantoff, P.W.; Schuetz, T.J.; Blumenstein, B.A.; Glode, L.M.; Bilhartz, D.L.; Wyand, M.; Manson, K.; Panicali, D.L.; Laus, R.; Schlom, J.; *et al.* Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1099-1105.
38. Terasawa, H.; Tsang, K.Y.; Gulley, J.; Arlen, P.; Schlom, J. Identification and characterization of a human agonist cytotoxic T-lymphocyte epitope of human prostate-specific antigen. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 41-53.
39. Madan, R.A.; Arlen, P.M.; Mohebtash, M.; Hodge, J.W.; Gulley, J.L. Prostavac-VF: A vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, *18*, 1001-1011.
40. Goldman, B.; DeFrancesco, L. The cancer vaccine roller coaster. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 129-139.
41. Tsang, K.Y.; Palena, C.; Gulley, J.; Arlen, P.; Schlom, J. A human cytotoxic T-lymphocyte epitope and its agonist epitope from the nonvariable number of tandem repeat sequence of MUC-1. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 2139-2149.
42. Zaremba, S.; Barzaga, E.; Zhu, M.; Soares, N.; Tsang, K.Y.; Schlom, J. Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4570-4577.
43. Dreicer, R.; Stadler, W.M.; Ahmann, F.R.; Whiteside, T.; Bizouarne, N.; Acres, B.; Limacher, J.M.; Squiban, P.; Pantuck, A. MVA-MUC1-IL2 vaccine immunotherapy (TG4010) improves PSA doubling time in patients with prostate cancer with biochemical failure. *Invest. New Drugs* **2009**, *27*, 379-386.
44. Acres, B. Cancer immunotherapy: Phase II clinical studies with TG4010 (MVA-MUC1-IL2). *J. BUON* **2007**, *12* (Suppl. 1), S71-S75.
45. Oudard, S.; Rixe, O.; Beuselinck, B.; Linassier, C.; Banu, E.; Machiels, J.P.; Baudard, M.; Ringeisen, F.; Velu, T.; Lefrere-Belda, M.A.; *et al.* A phase II study of the cancer vaccine TG4010 alone and in combination with cytokines in patients with metastatic renal clear-cell carcinoma: Clinical and immunological findings. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 261-271.
46. Butts, C.; Murray, N.; Maksymiuk, A.; Goss, G.; Marshall, E.; Soulieres, D.; Cormier, Y.; Ellis, P.; Price, A.; Sawhney, R.; *et al.* Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIB and IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 6674-6681.
47. Testori, A.; Richards, J.; Whitman, E.; Mann, G.B.; Lutzky, J.; Camacho, L.; Parmiani, G.; Tosti, G.; Kirkwood, J.M.; Hoos, A.; *et al.* Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: The C-100-21 Study Group. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 955-962.

48. Wood, C.; Srivastava, P.; Bukowski, R.; Lacombe, L.; Gorelov, A.I.; Gorelov, S.; Mulders, P.; Zielinski, H.; Hoos, A.; Teofilovici, F.; *et al.* An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) *versus* observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: A multicentre, open-label, randomised phase III trial. *Lancet* **2008**, *372*, 145-154.
49. Melief, C.J.; van der Burg, S.H. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 351-360.
50. Bijker, M.S.; van den Eeden, S.J.; Franken, K.L.; Melief, C.J.; van der Burg, S.H.; Offringa, R. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 1033-1042.
51. Jocham, D.; Richter, A.; Hoffmann, L.; Iwig, K.; Fahlenkamp, D.; Zakrzewski, G.; Schmitt, E.; Dannenberg, T.; Lehmacher, W.; von Wietersheim, J.; *et al.* Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: Phase III, randomised controlled trial. *Lancet* **2004**, *363*, 594-599.
52. Vermorken, J.B.; Claessen, A.M.; van Tinteren, H.; Gall, H.E.; Ezinga, R.; Meijer, S.; Scheper, R.J.; Meijer, C.J.; Bloemena, E.; Ransom, J.H.; *et al.* Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: A randomised trial. *Lancet* **1999**, *353*, 345-350.
53. Cassaday, R.D.; Sondel, P.M.; King, D.M.; Macklin, M.D.; Gan, J.; Warner, T.F.; Zuleger, C.L.; Bridges, A.J.; Schalch, H.G.; Kim, K.M.; *et al.* A phase I study of immunization using particle-mediated epidermal delivery of genes for gp100 and GM-CSF into uninvolved skin of melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 540-549.
54. McNeel, D.G.; Dunphy, E.J.; Davies, J.G.; Frye, T.P.; Johnson, L.E.; Staab, M.J.; Horvath, D.L.; Straus, J.; Alberti, D.; Marnocha, R.; *et al.* Safety and immunological efficacy of a DNA vaccine encoding prostatic acid phosphatase in patients with stage D0 prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 4047-4054.
55. Michaluart, P.; Abdallah, K.A.; Lima, F.D.; Smith, R.; Moyses, R.A.; Coelho, V.; Victora, G.D.; Socorro-Silva, A.; Volsi, E.C.; Zarate-Blades, C.R.; *et al.* Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Gene Ther.* **2008**, *15*, 676-684.
56. Pavlenko, M.; Roos, A.K.; Lundqvist, A.; Palmborg, A.; Miller, A.M.; Ozenci, V.; Bergman, B.; Egevad, L.; Hellstrom, M.; Kiessling, R.; *et al.* A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Br. J. Cancer* **2004**, *91*, 688-694.
57. Yuan, J.; Ku, G.Y.; Gallardo, H.F.; Orlandi, F.; Manukian, G.; Rasalan, T.S.; Xu, Y.; Li, H.; Vyas, S.; Mu, Z.; *et al.* Safety and immunogenicity of a human and mouse gp100 DNA vaccine in a phase I trial of patients with melanoma. *Cancer Immun.* **2009**, *9*, 5.
58. Caruso, D.A.; Orme, L.M.; Neale, A.M.; Radcliff, F.J.; Amor, G.M.; Maixner, W.; Downie, P.; Hassall, T.E.; Tang, M.L.; Ashley, D.M. Results of a phase 1 study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer. *Neuro Oncol.* **2004**, *6*, 236-246.

59. Dannull, J.; Su, Z.; Rizzieri, D.; Yang, B.K.; Coleman, D.; Yancey, D.; Zhang, A.; Dahm, P.; Chao, N.; Gilboa, E.; Vieweg, J. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 3623-3633.
60. Kyte, J.A.; Mu, L.; Aamdal, S.; Kvalheim, G.; Dueland, S.; Hauser, M.; Gullestad, H.P.; Ryder, T.; Lislerud, K.; Hammerstad, H.; Gaudernack, G. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther.* **2006**, *13*, 905-918.
61. Su, Z.; Dannull, J.; Heiser, A.; Yancey, D.; Pruitt, S.; Madden, J.; Coleman, D.; Niedzwiecki, D.; Gilboa, E.; Vieweg, J. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2127-2133.
62. Su, Z.; Dannull, J.; Yang, B.K.; Dahm, P.; Coleman, D.; Yancey, D.; Sichi, S.; Niedzwiecki, D.; Boczkowski, D.; Gilboa, E.; Vieweg, J. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 3798-3807.
63. Weide, B.; Pascolo, S.; Scheel, B.; Derhovanessian, E.; Pflugfelder, A.; Eigentler, T.K.; Pawelec, G.; Hoerr, I.; Rammensee, H.G.; Garbe, C. Direct injection of protamine-protected mRNA: Results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J. Immunother.* **2009**, *32*, 498-507.
64. Heiser, A.; Coleman, D.; Dannull, J.; Yancey, D.; Maurice, M.A.; Lallas, C.D.; Dahm, P.; Niedzwiecki, D.; Gilboa, E.; Vieweg, J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 409-417.
65. Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4-8.
66. Abdel-Motal, U.M.; Berg, L.; Rosen, A.; Bengtsson, M.; Thorpe, C.J.; Kihlberg, J.; Dahmen, J.; Magnusson, G.; Karlsson, K.A.; Jondal, M. Immunization with glycosylated Kb-binding peptides generates carbohydrate-specific, unrestricted cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26*, 544-551.
67. Cobb, B.A.; Wang, Q.; Tzianabos, A.O.; Kasper, D.L. Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell* **2004**, *117*, 677-687.
68. Galli-Stampino, L.; Meinjohanns, E.; Frische, K.; Meldal, M.; Jensen, T.; Werdelin, O.; Mouritsen, S. T-cell recognition of tumor-associated carbohydrates: The nature of the glycan moiety plays a decisive role in determining glycopeptide immunogenicity. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3214-3222.
69. Haurum, J.S.; Arsequell, G.; Lellouch, A.C.; Wong, S.Y.; Dwek, R.A.; McMichael, A.J.; Elliott, T. Recognition of carbohydrate by major histocompatibility complex class I-restricted, glycopeptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 739-744.
70. Haurum, J.S.; Hoier, I.B.; Arsequell, G.; Neisig, A.; Valencia, G.; Zeuthen, J.; Neefjes, J.; Elliott, T. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules *in vivo*. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 145-150.
71. Rudd, P.M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I.A.; Dwek, R.A. Glycosylation and the immune system. *Science* **2001**, *291*, 2370-2376.
72. Vlad, A.M.; Muller, S.; Cudic, M.; Paulsen, H.; Otvos, L., Jr.; Hanisch, F.G.; Finn, O.J. Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cells: Processing

- of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1435-1446.
73. Werdelin, O.; Meldal, M.; Jensen, T. Processing of glycans on glycoprotein and glycopeptide antigens in antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9611-9613.
74. Brockhausen, I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 67-95.
75. Kornfeld, R.; Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-664.
76. Brockhausen, I. Glycodynamics of mucin biosynthesis in gastrointestinal tumor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *535*, 163-188.
77. Hakomori, S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv. Cancer Res.* **1989**, *52*, 257-331.
78. Hakomori, S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: Basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2001**, *491*, 369-402.
79. Kim, Y.J.; Varki, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 569-576.
80. Spiro, R.G. Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R-56R.
81. Sell, S. Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum. Pathol.* **1990**, *21*, 1003-1019.
82. Fuster, M.M.; Esko, J.D. The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 526-542.
83. Livingston, P.O. Augmenting the immunogenicity of carbohydrate tumor antigens. *Semin. Cancer Biol.* **1995**, *6*, 357-366.
84. Livingston, P.O.; Ragupathi, G. Cancer vaccines targeting carbohydrate antigens. *Hum. Vaccin.* **2006**, *2*, 137-143.
85. Sabbatini, P.J.; Ragupathi, G.; Hood, C.; Aghajanian, C.A.; Juretzka, M.; Iasonos, A.; Hensley, M.L.; Spassova, M.K.; Ouerfelli, O.; Spriggs, D.R.; *et al.* Pilot study of a heptavalent vaccine-keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS21 in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4170-4177.
86. Retter, M.W.; Johnson, J.C.; Peckham, D.W.; Bannink, J.E.; Bangur, C.S.; Dresser, K.; Cai, F.; Foy, T.M.; Fanger, N.A.; Fanger, G.R.; *et al.* Characterization of a proapoptotic antiganglioside GM2 monoclonal antibody and evaluation of its therapeutic effect on melanoma and small cell lung carcinoma xenografts. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6425-6434.
87. Garcia, M.; Seigner, C.; Bastid, C.; Choux, R.; Payan, M.J.; Reggio, H. Carcinoembryonic antigen has a different molecular weight in normal colon and in cancer cells due to N-glycosylation differences. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5679-5686.
88. Hammarstrom, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: Structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* **1999**, *9*, 67-81.
89. Jankovic, M.M.; Kosanovic, M.M. Glycosylation of urinary prostate-specific antigen in benign hyperplasia and cancer: Assessment by lectin-binding patterns. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 58-65.

90. Matsuura, H.; Takio, K.; Titani, K.; Greene, T.; Levery, S.B.; Salyan, M.E.; Hakomori, S. The oncofetal structure of human fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6. Unique structural requirement for the antigenic specificity provided by a glycosylhexapeptide. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3314-3322.
91. McNeel, D.G.; Nguyen, L.D.; Storer, B.E.; Vessella, R.; Lange, P.H.; Disis, M.L. Antibody immunity to prostate cancer associated antigens can be detected in the serum of patients with prostate cancer. *J. Urol.* **2000**, *164*, 1825-1829.
92. Meany, D.L.; Zhang, Z.; Sokoll, L.J.; Zhang, H.; Chan, D.W. Glycoproteomics for prostate cancer detection: Changes in serum PSA glycosylation patterns. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 613-619.
93. Moss, E.L.; Hollingworth, J.; Reynolds, T.M. The role of CA125 in clinical practice. *J. Clin. Pathol.* **2005**, *58*, 308-312.
94. Cattaneo, A.; Biocca, S. The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 115-121.
95. Bouchet, J.; Basmaciogullari, S.E.; Chrobak, P.; Stolp, B.; Bouchard, N.; Fackler, O.T.; Chames, P.; Jolicoeur, P.; Benichou, S.; Baty, D. Inhibition of the Nef regulatory protein of HIV-1 by a single-domain antibody. *Blood* **2011**, doi: 10.1182/blood-2010-07-296749.
96. Bai, J.; Sui, J.; Zhu, R.Y.; Tallarico, A.S.; Gennari, F.; Zhang, D.; Marasco, W.A. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclinT1 intrabodies. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1433-1442.
97. Goncalves, J.; Silva, F.; Freitas-Vieira, A.; Santa-Marta, M.; Malho, R.; Yang, X.; Gabuzda, D.; Barbas, C., 3rd. Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32036-32045.
98. Levy-Mintz, P.; Duan, L.; Zhang, H.; Hu, B.; Dornadula, G.; Zhu, M.; Kulkosky, J.; Bizub-Bender, D.; Skalka, A.M.; Pomerantz, R.J. Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* **1996**, *70*, 8821-8832.
99. Wu, Y.; Duan, L.; Zhu, M.; Hu, B.; Kubota, S.; Bagasra, O.; Pomerantz, R.J. Binding of intracellular anti-Rev single chain variable fragments to different epitopes of human immunodeficiency virus type 1 rev: Variations in viral inhibition. *J. Virol.* **1996**, *70*, 3290-3297.
100. Tse, E.; Rabbitts, T.H. Intracellular antibody-caspase-mediated cell killing: An approach for application in cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12266-12271.
101. Alvarez, R.D.; Barnes, M.N.; Gomez-Navarro, J.; Wang, M.; Strong, T.V.; Arafat, W.; Arani, R.B.; Johnson, M.R.; Roberts, B.L.; Siegal, G.P.; *et al.* A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): A phase I trial. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3081-3087.
102. Arafat, W.; Gomez-Navarro, J.; Xiang, J.; Siegal, G.P.; Alvarez, R.D.; Curiel, D.T. Antineoplastic effect of anti-erbB-2 intrabody is not correlated with scFv affinity for its target. *Cancer Gene Ther.* **2000**, *7*, 1250-1256.
103. Arafat, W.O.; Gomez-Navarro, J.; Buchsbaum, D.J.; Xiang, J.; Wang, M.; Casado, E.; Barker, S.D.; Mahasreshti, P.J.; Haisma, H.J.; Barnes, M.N.; *et al.* Effective single chain antibody (scFv) concentrations *in vivo* via adenoviral vector mediated expression of secretory scFv. *Gene Ther.* **2002**, *9*, 256-262.

104. Deshane, J.; Siegal, G.P.; Alvarez, R.D.; Wang, M.H.; Feng, M.; Cabrera, G.; Liu, T.; Kay, M.; Curiel, D.T. Targeted tumor killing via an intracellular antibody against erbB-2. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 2980-2989.
105. Graus-Porta, D.; Beerli, R.R.; Hynes, N.E. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 1182-1191.
106. Hyland, S.; Beerli, R.R.; Barbas, C.F.; Hynes, N.E.; Wels, W. Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor. *Oncogene* **2003**, *22*, 1557-1567.
107. Richardson, J.H.; Hofmann, W.; Sodroski, J.G.; Marasco, W.A. Intrabody-mediated knockout of the high-affinity IL-2 receptor in primary human T cells using a bicistronic lentivirus vector. *Gene Ther.* **1998**, *5*, 635-644.
108. Richardson, J.H.; Sodroski, J.G.; Waldmann, T.A.; Marasco, W.A. Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the alpha subunit of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3137-3141.
109. Strube, R.W.; Chen, S.Y. Characterization of anti-cyclin E single-chain Fv antibodies and intrabodies in breast cancer cells: Enhanced intracellular stability of novel sFv-F(c) intrabodies. *J. Immunol. Methods* **2002**, *263*, 149-167.
110. Tanaka, T.; Rabbitts, T.H. Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *EMBO J.* **2003**, *22*, 1025-1035.
111. Wadia, J.S.; Dowdy, S.F. Protein transduction technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 52-56.
112. Allen, T.M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 750-763.
113. Nielsen, U.B.; Kirpotin, D.B.; Pickering, E.M.; Hong, K.; Park, J.W.; Refaat Shalaby, M.; Shao, Y.; Benz, C.C.; Marks, J.D. Therapeutic efficacy of anti-ErbB2 immunoliposomes targeted by a phage antibody selected for cellular endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1591*, 109-118.
114. Sapro, P.; Allen, T.M. Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 7190-7194.
115. Kulasingam, V.; Diamandis, E.P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2008**, *5*, 588-599.
116. Ludwig, J.A.; Weinstein, J.N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 845-856.
117. Shepard, H.M.; Jin, P.; Slamon, D.J.; Pirot, Z.; Maneval, D.C. Herceptin. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, 183-219.
118. Gutierrez, C.; Schiff, R. HER2: Biology, detection, and clinical implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2011**, *135*, 55-62.
119. Kesisis, G.; Kontovinis, L.F.; Gennatas, K.; Kortsaris, A.H. Biological markers in breast cancer prognosis and treatment. *J. BUON* **2010**, *15*, 447-454.
120. de Snoo, F.; Bender, R.; Glas, A.; Rutgers, E. Gene expression profiling: Decoding breast cancer. *Surg. Oncol.* **2009**, *18*, 366-378.
121. Turaga, K.; Acs, G.; Laronga, C. Gene expression profiling in breast cancer. *Cancer Control* **2010**, *17*, 177-182.

122. Guttman, A.; Csapo, Z.; Robbins, D. Rapid two-dimensional analysis of proteins by ultra-thin layer gel electrophoresis. *Proteomics* **2002**, *2*, 469-474.
123. O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007-4021.
124. Lee, S.J.; Evers, S.; Roeder, D.; Parlow, A.F.; Risteli, J.; Risteli, L.; Lee, Y.C.; Feizi, T.; Langen, H.; Nussenzweig, M.C. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* **2002**, *295*, 1898-1901.
125. Petricoin, E.F.; Ardekani, A.M.; Hitt, B.A.; Levine, P.J.; Fusaro, V.A.; Steinberg, S.M.; Mills, G.B.; Simone, C.; Fishman, D.A.; Kohn, E.C.; Liotta, L.A. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **2002**, *359*, 572-577.
126. Janzi, M.; Odling, J.; Pan-Hammarstrom, Q.; Sundberg, M.; Lundeberg, J.; Uhlen, M.; Hammarstrom, L.; Nilsson, P. Serum microarrays for large scale screening of protein levels. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1942-1947.
127. Loch, C.M.; Ramirez, A.B.; Liu, Y.; Sather, C.L.; Delrow, J.J.; Scholler, N.; Garvik, B.M.; Urban, N.D.; McIntosh, M.W.; Lampe, P.D. Use of high density antibody arrays to validate and discover cancer serum biomarkers. *Mol. Oncol.* **2007**, *1*, 313-320.
128. Rosenberg, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* **2001**, *411*, 380-384.
129. Preuss, K.D.; Zwick, C.; Bormann, C.; Neumann, F.; Pfreundschuh, M. Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol. Rev.* **2002**, *188*, 43-50.
130. Chen, Y.T. Cancer vaccine: Identification of human tumor antigens by SEREX. *Cancer J.* **2000**, *6* (Suppl. 3), S208-S217.
131. Boel, P.; Wildmann, C.; Sensi, M.L.; Brasseur, R.; Renaud, J.C.; Coulie, P.; Boon, T.; van der Bruggen, P. BAGE: A new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* **1995**, *2*, 167-175.
132. Coulie, P.G.; Lehmann, F.; Lethe, B.; Herman, J.; Lurquin, C.; Andrawiss, M.; Boon, T. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7976-7980.
133. Gaugler, B.; Van den Eynde, B.; van der Bruggen, P.; Romero, P.; Gaforio, J.J.; De Plaen, E.; Lethe, B.; Brasseur, F.; Boon, T. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1994**, *179*, 921-930.
134. Rosenberg, S.A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* **1999**, *10*, 281-287.
135. Cox, A.L.; Skipper, J.; Chen, Y.; Henderson, R.A.; Darrow, T.L.; Shabanowitz, J.; Engelhard, V.H.; Hunt, D.F.; Slingluff, C.L., Jr. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* **1994**, *264*, 716-719.
136. Pascolo, S.; Schirle, M.; Guckel, B.; Dumrese, T.; Stumm, S.; Kayser, S.; Moris, A.; Wallwiener, D.; Rammensee, H.G.; Stevanovic, S. A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4072-4077.
137. Hunt, D.F.; Michel, H.; Dickinson, T.A.; Shabanowitz, J.; Cox, A.L.; Sakaguchi, K.; Appella, E.; Grey, H.M.; Sette, A. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* **1992**, *256*, 1817-1820.

138. Monach, P.A.; Meredith, S.C.; Siegel, C.T.; Schreiber, H. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity* **1995**, *2*, 45-59.
139. Sahin, U.; Tureci, O.; Pfreundschuh, M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 709-716.
140. Tureci, O.; Sahin, U.; Pfreundschuh, M. Serological analysis of human tumor antigens: Molecular definition and implications. *Mol. Med. Today* **1997**, *3*, 342-349.
141. Gunawardana, C.G.; Diamandis, E.P. High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens. *Cancer Lett.* **2007**, *249*, 110-119.
142. Jager, D. Potential target antigens for immunotherapy identified by serological expression cloning (SEREX). *Methods Mol. Biol.* **2007**, *360*, 319-326.
143. Tan, H.T.; Low, J.; Lim, S.G.; Chung, M.C. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6880-6904.
144. Bodovitz, S.; Joos, T. The proteomics bottleneck: Strategies for preliminary validation of potential biomarkers and drug targets. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 4-7.
145. Anderson, N.L.; Anderson, N.G. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 845-867.
146. Bodzon-Kulakowska, A.; Bierczynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; Jarzebinska, J.; Silberring, J. Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *849*, 1-31.
147. Jebrail, M.J.; Luk, V.N.; Shih, S.C.; Fobel, R.; Ng, A.H.; Yang, H.; Freire, S.L.; Wheeler, A.R. Digital microfluidics for automated proteomic processing. *J. Vis. Exp.* **2009**, doi: 10.3791/1603.
148. Huang, H.L.; Stasyk, T.; Morandell, S.; Mogg, M.; Schreiber, M.; Feuerstein, I.; Huck, C.W.; Stecher, G.; Bonn, G.K.; Huber, L.A. Enrichment of low-abundant serum proteins by albumin/immunoglobulin G immunoaffinity depletion under partly denaturing conditions. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2843-2849.
149. Steel, L.F.; Trotter, M.G.; Nakajima, P.B.; Mattu, T.S.; Gonye, G.; Block, T. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 262-270.
150. Pieper, R.; Gatlin, C.L.; Makusky, A.J.; Russo, P.S.; Schatz, C.R.; Miller, S.S.; Su, Q.; McGrath, A.M.; Estock, M.A.; Parmar, P.P.; *et al.* The human serum proteome: Display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics* **2003**, *3*, 1345-1364.
151. Gong, Y.; Li, X.; Yang, B.; Ying, W.; Li, D.; Zhang, Y.; Dai, S.; Cai, Y.; Wang, J.; He, F.; *et al.* Different immunoaffinity fractionation strategies to characterize the human plasma proteome. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1379-1387.
152. Chen, E.I.; Yates, J.R., 3rd. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. *Mol. Oncol.* **2007**, *1*, 144-159.
153. Lacroix, M.; Leclercq, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: An update. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *83*, 249-289.
154. Vargo-Gogola, T.; Rosen, J.M. Modelling breast cancer: One size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 659-672.

155. Krogh, A.; Larsson, B.; von Heijne, G.; Sonnhammer, E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 567-580.
156. Pike, L.J. The challenge of lipid rafts. *J. Lipid. Res.* **2009**, *50* (Suppl.), S323-S328.
157. Wallin, E.; von Heijne, G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1029-1038.
158. Chambers, A.F.; Groom, A.C.; MacDonald, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 563-572.
159. Dowling, P.; Walsh, N.; Clynes, M. Membrane and membrane-associated proteins involved in the aggressive phenotype displayed by highly invasive cancer cells. *Proteomics* **2008**, *8*, 4054-4065.
160. Bergen, H.R., 3rd; Vasmatazis, G.; Cliby, W.A.; Johnson, K.L.; Oberg, A.L.; Muddiman, D.C. Discovery of ovarian cancer biomarkers in serum using NanoLC electrospray ionization TOF and FT-ICR mass spectrometry. *Dis. Markers* **2003**, *19*, 239-249.
161. Tammen, H.; Schulte, I.; Hess, R.; Menzel, C.; Kellmann, M.; Mohring, T.; Schulz-Knappe, P. Peptidomic analysis of human blood specimens: Comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. *Proteomics* **2005**, *5*, 3414-3422.
162. Chromy, B.A.; Gonzales, A.D.; Perkins, J.; Choi, M.W.; Corzett, M.H.; Chang, B.C.; Corzett, C.H.; McCutchen-Maloney, S.L. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 1120-1127.
163. Ramstrom, M.; Hagman, C.; Mitchell, J.K.; Derrick, P.J.; Hakansson, P.; Bergquist, J. Depletion of high-abundant proteins in body fluids prior to liquid chromatography fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 410-416.
164. Zhang, R.; Barker, L.; Pinchev, D.; Marshall, J.; Rasamoeliso, M.; Smith, C.; Kupchak, P.; Kireeva, I.; Ingratta, L.; Jackowski, G. Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics* **2004**, *4*, 244-256.
165. Bjorhall, K.; Miliotis, T.; Davidsson, P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics* **2005**, *5*, 307-317.
166. Ahmed, N.; Barker, G.; Oliva, K.T.; Hoffmann, P.; Riley, C.; Reeve, S.; Smith, A.I.; Kemp, B.E.; Quinn, M.A.; Rice, G.E. Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **2004**, *91*, 129-140.
167. Lopez, M.F.; Mikulskis, A.; Kuzdzal, S.; Bennett, D.A.; Kelly, J.; Golenko, E.; DiCesare, J.; Denoyer, E.; Patton, W.F.; Ediger, R.; *et al.* High-resolution serum proteomic profiling of Alzheimer disease samples reveals disease-specific, carrier-protein-bound mass signatures. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 1946-1954.
168. Zolotarjova, N.; Martosella, J.; Nicol, G.; Bailey, J.; Boyes, B.E.; Barrett, W.C. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics* **2005**, *5*, 3304-3313.
169. Bhat, V.B.; Choi, M.H.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Comparative plasma proteome analysis of lymphoma-bearing SJL mice. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1814-1825.
170. Govorukhina, N.I.; Reijmers, T.H.; Nyangoma, S.O.; van der Zee, A.G.; Jansen, R.C.; Bischoff, R. Analysis of human serum by liquid chromatography-mass spectrometry: Improved sample preparation and data analysis. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120*, 142-150.

171. Echan, L.A.; Tang, H.Y.; Ali-Khan, N.; Lee, K.; Speicher, D.W. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* **2005**, *5*, 3292-3303.
172. Chou, P.H.; Chen, S.H.; Liao, H.K.; Lin, P.C.; Her, G.R.; Lai, A.C.; Chen, J.H.; Lin, C.C.; Chen, Y.J. Nanoprobe-based affinity mass spectrometry for selected protein profiling in human plasma. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5990-5997.
173. Merrell, K.; Southwick, K.; Graves, S.W.; Esplin, M.S.; Lewis, N.E.; Thulin, C.D. Analysis of low-abundance, low-molecular-weight serum proteins using mass spectrometry. *J. Biomol. Tech.* **2004**, *15*, 238-248.
174. Aggelis, V.; Craven, R.A.; Peng, J.; Harnden, P.; Cairns, D.A.; Maher, E.R.; Tonge, R.; Selby, P.J.; Banks, R.E. Proteomic identification of differentially expressed plasma membrane proteins in renal cell carcinoma by stable isotope labelling of a von Hippel-Lindau transfectant cell line model. *Proteomics* **2009**, *9*, 2118-2130.
175. Conn, E.M.; Madsen, M.A.; Cravatt, B.F.; Ruf, W.; Deryugina, E.I.; Quigley, J.P. Cell surface proteomics identifies molecules functionally linked to tumor cell intravasation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 26518-26527.
176. Qiu, H.; Wang, Y. Quantitative analysis of surface plasma membrane proteins of primary and metastatic melanoma cells. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1904-1915.
177. Konstantinopoulos, P.A.; Spentzos, D.; Cannistra, S.A. Gene-expression profiling in epithelial ovarian cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2008**, *5*, 577-587.
178. Bignotti, E.; Tassi, R.A.; Calza, S.; Ravaggi, A.; Romani, C.; Rossi, E.; Falchetti, M.; Odicino, F.E.; Pecorelli, S.; Santin, A.D. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: Identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. *Gynecol. Oncol.* **2006**, *103*, 405-416.
179. Meinhold-Heerlein, I.; Bauerschlag, D.; Zhou, Y.; Sapinoso, L.M.; Ching, K.; Frierson, H., Jr.; Brautigam, K.; Sehouli, J.; Stickeler, E.; Konsgen, D.; *et al.* An integrated clinical-genomics approach identifies a candidate multi-analyte blood test for serous ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 458-466.
180. Welsh, J.B.; Sapinoso, L.M.; Kern, S.G.; Brown, D.A.; Liu, T.; Bauskin, A.R.; Ward, R.L.; Hawkins, N.J.; Quinn, D.I.; Russell, P.J.; *et al.* Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3410-3415.
181. Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871-874.
182. Campbell, G.T.; Bhatnagar, A.S. Simultaneous visualization by light microscopy of two pituitary hormones in a single tissue section using a combination of indirect immunohistochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* **1976**, *24*, 448-452.
183. Lathrop, J.T.; Hayes, T.K.; Carrick, K.; Hammond, D.J. Rarity gives a charm: Evaluation of trace proteins in plasma and serum. *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 393-406.
184. Gharbi, S.; Gaffney, P.; Yang, A.; Zvelebil, M.J.; Cramer, R.; Waterfield, M.D.; Timms, J.F. Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 91-98.

185. Lilley, K.S.; Razzaq, A.; Dupree, P. Two-dimensional gel electrophoresis: Recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 46-50.
186. Qin, S.; Ferdinand, A.S.; Richie, J.P.; O'Leary, M.P.; Mok, S.C.; Liu, B.C. Chromatofocusing fractionation and two-dimensional difference gel electrophoresis for low abundance serum proteins. *Proteomics* **2005**, *5*, 3183-3192.
187. Somiari, R.I.; Sullivan, A.; Russell, S.; Somiari, S.; Hu, H.; Jordan, R.; George, A.; Katenhusen, R.; Buchowiecka, A.; Arciero, C.; *et al.* High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* **2003**, *3*, 1863-1873.
188. Yu, K.H.; Rustgi, A.K.; Blair, I.A. Characterization of proteins in human pancreatic cancer serum using differential gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1742-1751.
189. Rui, Z.; Jian-Guo, J.; Yuan-Peng, T.; Hai, P.; Bing-Gen, R. Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. *Proteomics* **2003**, *3*, 433-439.
190. Unlu, M.; Morgan, M.E.; Minden, J.S. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2071-2077.
191. Kuwata, H.; Yip, T.T.; Yip, C.L.; Tomita, M.; Hutchens, T.W. Bactericidal domain of lactoferrin: Detection, quantitation, and characterization of lactoferrin in serum by SELDI affinity mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245*, 764-773.
192. Bischoff, R.; Luider, T.M. Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *803*, 27-40.
193. Cazares, L.H.; Adam, B.L.; Ward, M.D.; Nasim, S.; Schellhammer, P.F.; Semmes, O.J.; Wright, G.L., Jr. Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2541-2552.
194. Petricoin, E.F., 3rd; Ornstein, D.K.; Paweletz, C.P.; Ardekani, A.; Hackett, P.S.; Hitt, B.A.; Velasco, A.; Trucco, C.; Wiegand, L.; Wood, K.; *et al.* Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1576-1578.
195. Li, J.; Zhang, Z.; Rosenzweig, J.; Wang, Y.Y.; Chan, D.W. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 1296-1304.
196. Ricolleau, G.; Charbonnel, C.; Lode, L.; Loussouarn, D.; Joalland, M.P.; Bogumil, R.; Jourdain, S.; Minvielle, S.; Campone, M.; Deporte-Fety, R.; *et al.* Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors. *Proteomics* **2006**, *6*, 1963-1975.
197. Rosty, C.; Christa, L.; Kuzdzal, S.; Baldwin, W.M.; Zahurak, M.L.; Carnot, F.; Chan, D.W.; Canto, M.; Lillemoe, K.D.; Cameron, J.L.; *et al.* Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1868-1875.
198. Kozak, K.R.; Su, F.; Whitelegge, J.P.; Faull, K.; Reddy, S.; Farias-Eisner, R. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* **2005**, *5*, 4589-4596.

199. Malik, G.; Ward, M.D.; Gupta, S.K.; Trosset, M.W.; Grizzle, W.E.; Adam, B.L.; Diaz, J.I.; Semmes, O.J. Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 1073-1085.
200. Lebrecht, A.; Boehm, D.; Schmidt, M.; Koelbl, H.; Grus, F.H. Surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry to detect breast cancer markers in tears and serum. *Cancer Genomics Proteomics* **2009**, *6*, 75-83.
201. Baggerly, K.A.; Morris, J.S.; Coombes, K.R. Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: Comparing datasets from different experiments. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 777-785.
202. Diamandis, E.P. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: Opportunities and potential limitations. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 367-378.
203. Ornstein, D.K.; Gillespie, J.W.; Paweletz, C.P.; Duray, P.H.; Herring, J.; Vocke, C.D.; Topalian, S.L.; Bostwick, D.G.; Linehan, W.M.; Petricoin, E.F., 3rd; *et al.* Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and *in vitro* prostate cell lines. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2235-2242.
204. Bonner, R.F.; Emmert-Buck, M.; Cole, K.; Pohida, T.; Chuaqui, R.; Goldstein, S.; Liotta, L.A. Laser capture microdissection: Molecular analysis of tissue. *Science* **1997**, *278*, 1481,1483.
205. Simone, N.L.; Paweletz, C.P.; Charboneau, L.; Petricoin, E.F., 3rd; Liotta, L.A. Laser capture microdissection: Beyond functional genomics to proteomics. *Mol. Diagn.* **2000**, *5*, 301-307.
206. Allred, D.C.; Mohsin, S.K.; Fuqua, S.A. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr. Relat. Cancer* **2001**, *8*, 47-61.
207. Fuller, A.P.; Palmer-Toy, D.; Erlander, M.G.; Sgroi, D.C. Laser capture microdissection and advanced molecular analysis of human breast cancer. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* **2003**, *8*, 335-345.
208. Sugiyama, Y.; Sugiyama, K.; Hirai, Y.; Akiyama, F.; Hasumi, K. Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* **2002**, *117*, 109-116.
209. Wulfkuhle, J.D.; McLean, K.C.; Paweletz, C.P.; Sgroi, D.C.; Trock, B.J.; Steeg, P.S.; Petricoin, E.F., 3rd New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* **2001**, *1*, 1205-1215.
210. Gygi, S.P.; Rist, B.; Gerber, S.A.; Turecek, F.; Gelb, M.H.; Aebersold, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994-999.
211. Ross, P.L.; Huang, Y.N.; Marchese, J.N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1154-1169.
212. DeSouza, L.; Diehl, G.; Rodrigues, M.J.; Guo, J.; Romaschin, A.D.; Colgan, T.J.; Siu, K.W. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 377-386.
213. Yao, X.; Freas, A.; Ramirez, J.; Demirev, P.A.; Fenselau, C. Proteolytic ¹⁸O labeling for comparative proteomics: Model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2836-2842.
214. McDonald, W.H.; Yates, J.R., 3rd. Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Dis. Markers* **2002**, *18*, 99-105.

215. Koller, A.; Washburn, M.P.; Lange, B.M.; Andon, N.L.; Deciu, C.; Haynes, P.A.; Hays, L.; Schieltz, D.; Ulaszek, R.; Wei, J.; *et al.* Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11969-11974.
216. Washburn, M.P.; Ulaszek, R.R.; Yates, J.R., 3rd. Reproducibility of quantitative proteomic analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5054-5061.
217. Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 198-207.
218. Ewing, R.M.; Chu, P.; Elisma, F.; Li, H.; Taylor, P.; Climie, S.; McBroom-Cerajewski, L.; Robinson, M.D.; O'Connor, L.; Li, M.; *et al.* Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol. Syst. Biol.* **2007**, *3*, 89.
219. Markham, K.; Bai, Y.; Schmitt-Ulms, G. Co-immunoprecipitations revisited: An update on experimental concepts and their implementation for sensitive interactome investigations of endogenous proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 461-473.
220. Nicol, G.R.; Han, M.; Kim, J.; Birse, C.E.; Brand, E.; Nguyen, A.; Mesri, M.; FitzHugh, W.; Kaminker, P.; Moore, P.A.; *et al.* Use of an immunoaffinity-mass spectrometry-based approach for the quantification of protein biomarkers from serum samples of lung cancer patients. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1974-1982.
221. Hoogenboom, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1105-1116.
222. Nielsen, U.B.; Marks, J.D. Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: Direct selection from phage display libraries. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, *3*, 282-291.
223. Behar, G.; Chames, P.; Teulon, I.; Cornillon, A.; Alshoukr, F.; Roquet, F.; Pugniere, M.; Teillaud, J.L.; Gruaz-Guyon, A.; Pelegrin, A.; *et al.* Llama single-domain antibodies directed against nonconventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen absent from nonspecific cross-reacting antigen. *FEBS J.* **2009**, *276*, 3881-3893.
224. Kastelic, D.; Frkovic-Grazio, S.; Baty, D.; Truan, G.; Komel, R.; Pompon, D. A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. *J. Immunol. Methods* **2009**, *350*, 54-62.
225. Marks, C.; Marks, J.D. Phage libraries—A new route to clinically useful antibodies. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 730-733.
226. Sheets, M.D.; Amersdorfer, P.; Finnern, R.; Sargent, P.; Lindquist, E.; Schier, R.; Hemingsen, G.; Wong, C.; Gerhart, J.C.; Marks, J.D. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: The production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6157-6162.
227. Gao, C.; Mao, S.; Ronca, F.; Zhuang, S.; Quaranta, V.; Wirsching, P.; Janda, K.D. *De novo* identification of tumor-specific internalizing human antibody-receptor pairs by phage-display methods. *J. Immunol. Methods* **2003**, *274*, 185-197.
228. Geuijen, C.A.; Bijl, N.; Smit, R.C.; Cox, F.; Throsby, M.; Visser, T.J.; Jongeneelen, M.A.; Bakker, A.B.; Kruisbeek, A.M.; Goudsmit, J.; *et al.* A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 178-187.

229. Heitner, T.; Moor, A.; Garrison, J.L.; Marks, C.; Hasan, T.; Marks, J.D. Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library. *J. Immunol. Methods* **2001**, *248*, 17-30.
230. Liu, B.; Conrad, F.; Cooperberg, M.R.; Kirpotin, D.B.; Marks, J.D. Mapping tumor epitope space by direct selection of single-chain Fv antibody libraries on prostate cancer cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 704-710.
231. Mazuet, C.; Lerouge, D.; Poul, M.A.; Blin, N. Breast carcinoma specific antibody selection combining phage display and immunomagnetic cell sorting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *348*, 550-559.
232. MacBeath, G.; Schreiber, S.L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **2000**, *289*, 1760-1763.
233. Lal, S.P.; Christopherson, R.I.; dos Remedios, C.G. Antibody arrays: An embryonic but rapidly growing technology. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, S143-149.
234. Templin, M.F.; Stoll, D.; Schrenk, M.; Traub, P.C.; Vohringer, C.F.; Joos, T.O. Protein microarray technology. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 815-822.
235. Wilson, D.S.; Nock, S. Recent developments in protein microarray technology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 494-500.
236. Houseman, B.T.; Huh, J.H.; Kron, S.J.; Mrksich, M. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 270-274.
237. Zhu, H.; Snyder, M. Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 55-63.
238. MacBeath, G. Protein microarrays and proteomics. *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 526-532.
239. Stromberg, S.; Bjorklund, M.G.; Asplund, C.; Skollermo, A.; Persson, A.; Wester, K.; Kampf, C.; Nilsson, P.; Andersson, A.C.; Uhlen, M.; *et al.* A high-throughput strategy for protein profiling in cell microarrays using automated image analysis. *Proteomics* **2007**, *7*, 2142-2150.
240. Kononen, J.; Bubendorf, L.; Kallioniemi, A.; Barlund, M.; Schraml, P.; Leighton, S.; Torhorst, J.; Mihatsch, M.J.; Sauter, G.; Kallioniemi, O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 844-847.
241. Lueking, A.; Horn, M.; Eickhoff, H.; Bussow, K.; Lehrach, H.; Walter, G. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal. Biochem.* **1999**, *270*, 103-111.
242. Knezevic, V.; Leethanakul, C.; Bichsel, V.E.; Worth, J.M.; Prabhu, V.V.; Gutkind, J.S.; Liotta, L.A.; Munson, P.J.; Petricoin, E.F., 3rd; Krizman, D.B. Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays. *Proteomics* **2001**, *1*, 1271-1278.
243. Ge, H. UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions. *Nucl. Acid. Res.* **2000**, *28*, e3.
244. Arenkov, P.; Kukhtin, A.; Gemmell, A.; Voloshchuk, S.; Chupeeva, V.; Mirzabekov, A. Protein microchips: Use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem.* **2000**, *278*, 123-131.
245. Haab, B.B.; Dunham, M.J.; Brown, P.O. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol.* **2001**, *2*, RESEARCH0004.
246. Madoz-Gurpide, J.; Wang, H.; Misek, D.E.; Brichory, F.; Hanash, S.M. Protein based microarrays: A tool for probing the proteome of cancer cells and tissues. *Proteomics* **2001**, *1*, 1279-1287.

247. Mendoza, L.G.; McQuary, P.; Mongan, A.; Gangadharan, R.; Brignac, S.; Eggers, M. High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques* **1999**, *27*, 778-788.
248. Woodbury, R.L.; Varnum, S.M.; Zangar, R.C. Elevated HGF levels in sera from breast cancer patients detected using a protein microarray ELISA. *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 233-237.
249. Even-Desrumeaux, K.; Baty, D.; Chames, P. Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 2241-2248.
250. Hsu, H.Y.; Wittemann, S.; Joos, T.O. Miniaturized parallelized sandwich immunoassays. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *428*, 247-261.
251. Ramachandran, N.; Raphael, J.V.; Hainsworth, E.; Demirkan, G.; Fuentes, M.G.; Rolfs, A.; Hu, Y.; LaBaer, J. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 535-538.
252. Stemke-Hale, K.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Lluch, A.; Neve, R.M.; Kuo, W.L.; Davies, M.; Carey, M.; Hu, Z.; Guan, Y.; Sahin, A.; *et al.* An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 6084-6091.
253. Rousserie, G.; Sukhanova, A.; Even-Desrumeaux, K.; Fleury, F.; Chames, P.; Baty, D.; Oleinikov, V.; Pluot, M.; Cohen, J.H.; Nabiev, I. Semiconductor quantum dots for multiplexed bio-detection on solid-state microarrays. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2010**, *74*, 1-15.
254. Hurst, R.; Hook, B.; Slater, M.R.; Hartnett, J.; Storts, D.R.; Nath, N. Protein-protein interaction studies on protein arrays: Effect of detection strategies on signal-to-background ratios. *Anal. Biochem.* **2009**, *392*, 45-53.
255. Iliopoulos, D.; Malizos, K.N.; Oikonomou, P.; Tsezou, A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* **2008**, *3*, e3740.
256. Morgan, E.; Varro, R.; Sepulveda, H.; Ember, J.A.; Apgar, J.; Wilson, J.; Lowe, L.; Chen, R.; Shivraj, L.; Agadir, A.; *et al.* Cytometric bead array: A multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin. Immunol.* **2004**, *110*, 252-266.
257. Paweletz, C.P.; Charboneau, L.; Bichsel, V.E.; Simone, N.L.; Chen, T.; Gillespie, J.W.; Emmert-Buck, M.R.; Roth, M.J.; Petricoin, I.E.; Liotta, L.A. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* **2001**, *20*, 1981-1989.
258. Sheehan, K.M.; Calvert, V.S.; Kay, E.W.; Lu, Y.; Fishman, D.; Espina, V.; Aquino, J.; Speer, R.; Araujo, R.; Mills, G.B.; *et al.* Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 346-355.
259. Poetz, O.; Schwenk, J.M.; Kramer, S.; Stoll, D.; Templin, M.F.; Joos, T.O. Protein microarrays: Catching the proteome. *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126*, 161-170.
260. Templin, M.F.; Stoll, D.; Schwenk, J.M.; Potz, O.; Kramer, S.; Joos, T.O. Protein microarrays: Promising tools for proteomic research. *Proteomics* **2003**, *3*, 2155-2166.
261. Proll, G.; Steinle, L.; Proll, F.; Kumpf, M.; Moehrle, B.; Mehlmann, M.; Gauglitz, G. Potential of label-free detection in high-content-screening applications. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1161*, 2-8.

262. McDonnell, J.M. Surface plasmon resonance: Towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 572-577.
263. Wegner, G.J.; Wark, A.W.; Lee, H.J.; Codner, E.; Saeki, T.; Fang, S.; Corn, R.M. Real-time surface plasmon resonance imaging measurements for the multiplexed determination of protein adsorption/desorption kinetics and surface enzymatic reactions on peptide microarrays. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5677-5684.
264. Yu, X.; Xu, D.; Cheng, Q. Label-free detection methods for protein microarrays. *Proteomics* **2006**, *6*, 5493-5503.
265. Borch, J.; Roepstorff, P. Screening for enzyme inhibitors by surface plasmon resonance combined with mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5243-5248.
266. McLafferty, F.W.; Fridriksson, E.K.; Horn, D.M.; Lewis, M.A.; Zubarev, R.A. Techview: Biochemistry. Biomolecule mass spectrometry. *Science* **1999**, *284*, 1289-1290.
267. Zheng, G.; Patolsky, F.; Cui, Y.; Wang, W.U.; Lieber, C.M. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1294-1301.
268. Zhukov, A.; Schurenberg, M.; Jansson, O.; Areskoug, D.; Buijs, J. Integration of surface plasmon resonance with mass spectrometry: Automated ligand fishing and sample preparation for MALDI MS using a Biacore 3000 biosensor. *J. Biomol. Tech.* **2004**, *15*, 112-119.
269. Wan, W.H.; Fortuna, M.B.; Furmanski, P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J. Immunol. Methods* **1987**, *103*, 121-129.
270. Schoenberg Fejzo, M.; Slamon, D.J. Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA, and proteins. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 1645-1650.
271. Li, R.; Ni, J.; Bourne, P.A.; Yeh, S.; Yao, J.; di Sant'Agnes, P.A.; Huang, J. Cell culture block array for immunocytochemical study of protein expression in cultured cells. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2005**, *13*, 85-90.
272. Montgomery, K.; Zhao, S.; van de Rijn, M.; Natkunam, Y. A novel method for making "tissue" microarrays from small numbers of suspension cells. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2005**, *13*, 80-84.
273. Datta, M.W.; Kahler, A.; Macias, V.; Brodzeller, T.; Kajdacsy-Balla, A. A simple inexpensive method for the production of tissue microarrays from needle biopsy specimens: Examples with prostate cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2005**, *13*, 96-103.
274. Camp, R.L.; Charette, L.A.; Rimm, D.L. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab. Invest.* **2000**, *80*, 1943-1949.
275. Torhorst, J.; Bucher, C.; Kononen, J.; Haas, P.; Zuber, M.; Kochli, O.R.; Mross, F.; Dieterich, H.; Moch, H.; Mihatsch, M.; *et al.* Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 2249-2256.
276. Persson, A.; Hober, S.; Uhlen, M. A human protein atlas based on antibody proteomics. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2006**, *8*, 185-190.
277. Lehmann, F.; Tiralongo, E.; Tiralongo, J. Sialic acid-specific lectins: Occurrence, specificity and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1331-1354.

278. Block, T.M.; Comunale, M.A.; Lowman, M.; Steel, L.F.; Romano, P.R.; Fimmel, C.; Tennant, B.C.; London, W.T.; Evans, A.A.; Blumberg, B.S.; *et al.* Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 779-784.
279. Dube, D.H.; Bertozzi, C.R. Glycans in cancer and inflammation—Potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 477-488.
280. Peracaula, R.; Barrabes, S.; Sarrats, A.; Rudd, P.M.; de Llorens, R. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis. Markers* **2008**, *25*, 207-218.
281. Perkins, G.L.; Slater, E.D.; Sanders, G.K.; Prichard, J.G. Serum tumor markers. *Am. Fam. Phys.* **2003**, *68*, 1075-1082.
282. Shariat, S.F.; Karam, J.A.; Margulis, V.; Karakiewicz, P.I. New blood-based biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer. *BJU Int.* **2008**, *101*, 675-683.
283. Selby, D.S.; Larsen, M.R.; Calvano, C.D.; Jensen, O.N. Identification and characterization of N-glycosylated proteins using proteomics. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *484*, 263-276.
284. Taylor, A.D.; Hancock, W.S.; Hincapie, M.; Taniguchi, N.; Hanash, S.M. Towards an integrated proteomic and glycomic approach to finding cancer biomarkers. *Genome Med.* **2009**, *1*, 57.
285. Wang, Y.; Ao, X.; Vuong, H.; Konanur, M.; Miller, F.R.; Goodison, S.; Lubman, D.M. Membrane glycoproteins associated with breast tumor cell progression identified by a lectin affinity approach. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 4313-4325.
286. Cho, W.; Jung, K.; Regnier, F.E. Use of glycan targeting antibodies to identify cancer-associated glycoproteins in plasma of breast cancer patients. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5286-5292.
287. Dalpathado, D.S.; Desaire, H. Glycopeptide analysis by mass spectrometry. *Analyst* **2008**, *133*, 731-738.
288. Powlesland, A.S.; Hitchen, P.G.; Parry, S.; Graham, S.A.; Barrio, M.M.; Elola, M.T.; Mordoh, J.; Dell, A.; Drickamer, K.; Taylor, M.E. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology* **2009**, *19*, 899-909.
289. Comunale, M.A.; Wang, M.; Hafner, J.; Krakover, J.; Rodemich, L.; Kopenhaver, B.; Long, R.E.; Junaidi, O.; Bisceglie, A.M.; Block, T.M.; *et al.* Identification and development of fucosylated glycoproteins as biomarkers of primary hepatocellular carcinoma. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 595-602.
290. Jung, K.; Cho, W.; Regnier, F.E. Glycoproteomics of plasma based on narrow selectivity lectin affinity chromatography. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 643-650.
291. Xiong, L.; Andrews, D.; Regnier, F. Comparative proteomics of glycoproteins based on lectin selection and isotope coding. *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 618-625.
292. Larsen, M.R.; Trelle, M.B.; Thingholm, T.E.; Jensen, O.N. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *Biotechniques* **2006**, *40*, 790-798.
293. Moore, A.; Medarova, Z.; Potthast, A.; Dai, G. *In vivo* targeting of underglycosylated MUC-1 tumor antigen using a multimodal imaging probe. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1821-1827.

Références bibliographiques

- Afanassiev, V., V. Hanemann, et al. (2000). "Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film." *Nucleic Acids Res* 28(12): E66.
- Aina, O. H., T. C. Sroka, et al. (2002). "Therapeutic cancer targeting peptides." *Biopolymers* 66(3): 184-199.
- Allard, W. J., J. Matera, et al. (2004). "Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases." *Clin Cancer Res* 10(20): 6897-6904.
- Alvarez-Rueda, N., G. Behar, et al. (2007). "Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical hapten." *Mol Immunol* 44(7): 1680-1690.
- Alzogaray, V., W. Danquah, et al. (2011). "Single-domain llama antibodies as specific intracellular inhibitors of SpvB, the actin ADP-ribosylating toxin of *Salmonella typhimurium*." *FASEB J* 25(2): 526-534.
- Amit, A. G., R. A. Mariuzza, et al. (1986). "Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution." *Science* 233(4765): 747-753.
- Anderson, G. P. and E. R. Goldman (2008). "TNT detection using llama antibodies and a two-step competitive fluid array immunoassay." *J Immunol Methods* 339(1): 47-54.
- Anderson, L. and J. Seilhamer (1997). "A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver." *Electrophoresis* 18(3-4): 533-537.
- Andre, F., N. Berrada, et al. (2010). "Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients." *Curr Opin Oncol* 22(6): 547-551.
- Angenendt, P., J. Glokler, et al. (2002). "Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials." *Anal Biochem* 309(2): 253-260.
- Arenkov, P., A. Kukhtin, et al. (2000). "Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions." *Anal Biochem* 278(2): 123-131.
- Bacarese-Hamilton, T., J. Gray, et al. (2005). "Allergen microarrays." *Methods Mol Med* 114: 195-207.
- Bae, K. H., Y. D. Kwon, et al. (2003). "Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors." *Nat Biotechnol* 21(3): 275-280.
- Baptista, P. V., G. Doria, et al. (2011). "Nanoparticles in molecular diagnostics." *Prog Mol Biol Transl Sci* 104: 427-488.
- Barak, V., H. Goike, et al. (2004). "Clinical utility of cytokeratins as tumor markers." *Clin Biochem* 37(7): 529-540.
- Barbas, C. F., 3rd, A. S. Kang, et al. (1991). "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18): 7978-7982.
- Bardhan, R., S. Lal, et al. (2011). "Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer." *Acc Chem Res* 44(10): 936-946.
- Barrett, B. and P. McKenna (2011). "Communicating benefits and risks of screening for prostate, colon, and breast cancer." *Fam Med* 43(4): 248-253.
- Behar, G., S. Siberil, et al. (2008). "Isolation and characterization of anti-FcγRIII (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells." *Protein Eng Des Sel* 21(1): 1-10.
- Bertram, J. S. (2000). "The molecular biology of cancer." *Mol Aspects Med* 21(6): 167-223.
- Better, M., C. P. Chang, et al. (1988). "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment." *Science* 240(4855): 1041-1043.

- Bilitewski, U. (2006). "Protein-sensing assay formats and devices." *Anal Chim Acta* 568(1-2): 232-247.
- Birch, J. R. and A. J. Racher (2006). "Antibody production." *Adv Drug Deliv Rev* 58(5-6): 671-685.
- Bird, R. E., K. D. Hardman, et al. (1988). "Single-chain antigen-binding proteins." *Science* 242(4877): 423-426.
- Bischoff, R. and T. M. Luider (2004). "Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 803(1): 27-40.
- Blackburn, J. M. and D. J. Hart (2005). "Fabrication of protein function microarrays for systems-oriented proteomic analysis." *Methods Mol Biol* 310: 197-216.
- Borrebaeck, C. A. (2006). "Antibody microarray-based oncoproteomics." *Expert Opin Biol Ther* 6(8): 833-838.
- Boscato, L. M. and M. C. Stuart (1986). "Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays." *Clin Chem* 32(8): 1491-1495.
- Bosma, A. J., B. Weigelt, et al. (2002). "Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes." *Clin Cancer Res* 8(6): 1871-1877.
- Bouchet, J., S. E. Basmaciogullari, et al. (2011). "Inhibition of the Nef regulatory protein of HIV-1 by a single-domain antibody." *Blood*.
- Bradbury, A. R., S. Sidhu, et al. (2011). "Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies." *Nat Biotechnol* 29(3): 245-254.
- Bratkovic, T. (2010). "Progress in phage display: evolution of the technique and its application." *Cell Mol Life Sci* 67(5): 749-767.
- Braun, S., F. D. Vogl, et al. (2007). "Disseminated tumor cells: are they ready for clinical use?" *Breast* 16 Suppl 2: S51-54.
- Brillhart, K. L. and T. T. Ngo (1991). "Use of microwell plates carrying hydrazide groups to enhance antibody immobilization in enzyme immunoassays." *J Immunol Methods* 144(1): 19-25.
- Bubendorf, L., A. Nocito, et al. (2001). "Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies." *J Pathol* 195(1): 72-79.
- Caberoy, N. B., Y. Zhou, et al. (2010). "Efficient identification of tubby-binding proteins by an improved system of T7 phage display." *J Mol Recognit* 23(1): 74-83.
- Cardinale, A. and S. Biocca (2008). "The potential of intracellular antibodies for therapeutic targeting of protein-misfolding diseases." *Trends Mol Med* 14(9): 373-380.
- Catt, K., H. D. Niall, et al. (1967). "Solid phase radioimmunoassay." *Nature* 213(5078): 825-827.
- Chang, H. J., B. C. Yoo, et al. (2005). "Metabotropic glutamate receptor 4 expression in colorectal carcinoma and its prognostic significance." *Clin Cancer Res* 11(9): 3288-3295.
- Chenard, M. P., C. Tomasetto, et al. (2004). "Urinary pS2/TFF1 levels in the management of hormonodependent breast carcinomas." *Peptides* 25(5): 737-743.
- Cheng, L., A. V. Ramesh, et al. (2010). "Mouse models for cancer stem cell research." *Toxicol Pathol* 38(1): 62-71.
- Chiari, M., M. Cretich, et al. (2005). "Peptide microarrays for the characterization of antigenic regions of human chromogranin A." *Proteomics* 5(14): 3600-3603.
- Cichon, M. A., A. C. Degnim, et al. (2010). "Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15(4): 389-397.
- Combaret, V., C. Bergeron, et al. (2005). "Protein chip array profiling analysis of sera from neuroblastoma patients." *Cancer Lett* 228(1-2): 91-96.

- Conrath, K., A. S. Pereira, et al. (2009). "Camelid nanobodies raised against an integral membrane enzyme, nitric oxide reductase." *Protein Sci* 18(3): 619-628.
- Conway, J. O., L. J. Sherwood, et al. (2010). "Llama single domain antibodies specific for the 7 botulinum neurotoxin serotypes as heptaplex immunoreagents." *PLoS One* 5(1): e8818.
- Cooper, M. A. (2002). "Optical biosensors in drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 1(7): 515-528.
- Cortez-Retamozo, V., N. Backmann, et al. (2004). "Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate." *Cancer Res* 64(8): 2853-2857.
- Cousino, M. A., T. B. Jarbawi, et al. (1997). "Pushing down the limits of detection: molecular needles in a haystack." *Anal Chem* 69(17): 544A-549A.
- Cretich, M., F. Damin, et al. (2006). "Protein and peptide arrays: recent trends and new directions." *Biomol Eng* 23(2-3): 77-88.
- Cristofanilli, M. and J. Mendelsohn (2006). "Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for "tailored" therapy?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46): 17073-17074.
- Cummings, M. C., R. Chambers, et al. (2011). "Molecular classification of breast cancer: is it time to pack up our microscopes?" *Pathology* 43(1): 1-8.
- Davis, C. A. and S. Benzer (1997). "Generation of cDNA expression libraries enriched for in-frame sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2128-2132.
- Davis, T. M. and W. D. Wilson (2000). "Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data." *Anal Biochem* 284(2): 348-353.
- de Cremoux, P., J. M. Extra, et al. (2000). "Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction." *Clin Cancer Res* 6(8): 3117-3122.
- De Genst, E., K. Silence, et al. (2006). "Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12): 4586-4591.
- De La Lande, B., K. Hacene, et al. (2002). "Prognostic value of CA 15.3 kinetics for metastatic breast cancer." *Int J Biol Markers* 17(4): 231-238.
- de Marco, A. (2011). "Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments." *Microb Cell Fact* 10: 44.
- Dean, A. (2008). "Primary breast cancer: risk factors, diagnosis and management." *Nurs Stand* 22(40): 47-55; quiz 58, 60.
- DeRisi, J. L., V. R. Iyer, et al. (1997). "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale." *Science* 278(5338): 680-686.
- DeSantis, C., R. Siegel, et al. (2011). "Breast cancer statistics, 2011." *CA Cancer J Clin* 61(6): 409-418.
- Devine, P. L., M. A. Duroux, et al. (1995). "CA15-3, CASA, MSA, and TPS as diagnostic serum markers in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 34(3): 245-251.
- Diamond, S. L. (2007). "Methods for mapping protease specificity." *Curr Opin Chem Biol* 11(1): 46-51.
- Dillman, R. O. (2011). "Cancer immunotherapy." *Cancer Biother Radiopharm* 26(1): 1-64.
- Dmitriev, D. A., Y. S. Massino, et al. (2003). "Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor." *J Immunol Methods* 280(1-2): 183-202.
- Dolk, E., C. van Vliet, et al. (2005). "Induced refolding of a temperature denatured llama heavy-chain antibody fragment by its antigen." *Proteins* 59(3): 555-564.
- Dona, V., M. Urrutia, et al. (2010). "Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions." *J Agric Food Chem* 58(2): 918-926.

- Dong, J., A. A. Thompson, et al. (2010). "A single-domain llama antibody potently inhibits the enzymatic activity of botulinum neurotoxin by binding to the non-catalytic alpha-exosite binding region." *J Mol Biol* 397(4): 1106-1118.
- Dossus, L. and R. Kaaks (2008). "Nutrition, metabolic factors and cancer risk." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(4): 551-571.
- Dove, S. L., J. K. Joung, et al. (1997). "Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts." *Nature* 386(6625): 627-630.
- Doyle, P. J., M. Arbabi-Ghahroudi, et al. (2008). "Cloning, expression, and characterization of a single-domain antibody fragment with affinity for 15-acetyl-deoxynivalenol." *Mol Immunol* 45(14): 3703-3713.
- Doyle, P. J., H. Saeed, et al. (2009). "Intracellular expression of a single domain antibody reduces cytotoxicity of 15-acetyldeoxynivalenol in yeast." *J Biol Chem* 284(50): 35029-35039.
- Drake, P. M., B. Schilling, et al. (2012). "A lectin chromatography/mass spectrometry discovery workflow identifies putative biomarkers of aggressive breast cancers." *J Proteome Res*.
- Duenas, M. and C. A. Borrebaeck (1994). "Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication." *Biotechnology (N Y)* 12(10): 999-1002.
- Duffy, M. J., D. Evoy, et al. (2010). "CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer." *Clin Chim Acta* 411(23-24): 1869-1874.
- Dumoulin, M., K. Conrath, et al. (2002). "Single-domain antibody fragments with high conformational stability." *Protein Sci* 11(3): 500-515.
- Edelman, G. M. (1973). "Antibody structure and molecular immunology." *Science* 180(88): 830-840.
- Ekins, R., F. Chu, et al. (1990). "Multispot, multianalyte, immunoassay." *Ann Biol Clin (Paris)* 48(9): 655-666.
- Ekins, R. and F. W. Chu (1999). "Microarrays: their origins and applications." *Trends Biotechnol* 17(6): 217-218.
- Ekins, R. P. (1989). "Multi-analyte immunoassay." *J Pharm Biomed Anal* 7(2): 155-168.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." *Immunochemistry* 8(9): 871-874.
- Ermolenko, D. N., A. V. Zherdev, et al. (2004). "Antibodies as specific chaperones." *Biochemistry (Mosc)* 69(11): 1233-1238.
- Espina, V., E. C. Woodhouse, et al. (2004). "Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies." *J Immunol Methods* 290(1-2): 121-133.
- Essler, M. and E. Ruoslahti (2002). "Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4): 2252-2257.
- Evans, A. and P. Whelehan (2011). "Breast screening policy: are we heading in the right direction?" *Clin Radiol* 66(10): 915-919.
- Fack, F., B. Hugel-Dorr, et al. (1997). "Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries." *J Immunol Methods* 206(1-2): 43-52.
- Falsey, J. R., M. Renil, et al. (2001). "Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays." *Bioconjug Chem* 12(3): 346-353.
- Famm, K., L. Hansen, et al. (2008). "Thermodynamically stable aggregation-resistant antibody domains through directed evolution." *J Mol Biol* 376(4): 926-931.
- Fehm, T., P. Maimonis, et al. (1997). "Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients." *Breast Cancer Res Treat* 43(1): 87-95.
- Fenn, J. B., M. Mann, et al. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* 246(4926): 64-71.

- Fernandez-Medarde, A. and E. Santos (2011). "Ras in cancer and developmental diseases." *Genes Cancer* 2(3): 344-358.
- Fernie, A. R., R. N. Trethewey, et al. (2004). "Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9): 763-769.
- Ferreira, G. N., J. M. Encarnacao, et al. (2007). "Recombinant single-chain variable fragment and single domain antibody piezoimmunosensors for detection of HIV1 virion infectivity factor." *Biosens Bioelectron* 23(3): 384-392.
- Fichtner, I., M. Becker, et al. (2004). "In vivo models for endocrine-dependent breast carcinomas: special considerations of clinical relevance." *Eur J Cancer* 40(6): 845-851.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* 340(6230): 245-246.
- Fivash, M., E. M. Towler, et al. (1998). "BIAcore for macromolecular interaction." *Curr Opin Biotechnol* 9(1): 97-101.
- Fleming, T. P. and M. A. Watson (2000). "Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer." *Ann N Y Acad Sci* 923: 78-89.
- Fodor, S. P., J. L. Read, et al. (1991). "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." *Science* 251(4995): 767-773.
- Forsman, A., E. Beirnaert, et al. (2008). "Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120." *J Virol* 82(24): 12069-12081.
- Fuh, G., M. T. Pisabarro, et al. (2000). "Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display." *J Biol Chem* 275(28): 21486-21491.
- Gao, X., E. Gulari, et al. (2004). "In situ synthesis of oligonucleotide microarrays." *Biopolymers* 73(5): 579-596.
- Garaicoechea, L., A. Olichon, et al. (2008). "Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice." *J Virol* 82(19): 9753-9764.
- Garra, B. S. (2011). "Elastography: current status, future prospects, and making it work for you." *Ultrasound Q* 27(3): 177-186.
- Garufi, G., O. Minenkova, et al. (2005). "Display libraries on bacteriophage lambda capsid." *Biotechnol Annu Rev* 11: 153-190.
- Ge, H. (2000). "UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions." *Nucleic Acids Res* 28(2): e3.
- Gemignani, M. L. (2011). "Breast cancer screening: why, when, and how many?" *Clin Obstet Gynecol* 54(1): 125-132.
- Gendler, S. J., C. A. Lancaster, et al. (1990). "Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin." *J Biol Chem* 265(25): 15286-15293.
- Gevaert, K. and J. Vandekerckhove (2000). "Protein identification methods in proteomics." *Electrophoresis* 21(6): 1145-1154.
- Geysen, H. M., T. J. Mason, et al. (1988). "Cognitive features of continuous antigenic determinants." *J Mol Recognit* 1(1): 32-41.
- Giai, M., R. Roagna, et al. (1996). "TPS and CA 15.3 serum values as a guide for treating and monitoring breast cancer patients." *Anticancer Res* 16(2): 875-881.
- Gisselsson, D. (2011). "Intratumor diversity and clonal evolution in cancer--a skeptical standpoint." *Adv Cancer Res* 112: 1-9.
- Giuliano, A. E. and S. H. Han (2011). "Local and regional control in breast cancer: role of sentinel node biopsy." *Adv Surg* 45: 101-116.
- Goding, J. W. (1978). "Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent." *J Immunol Methods* 20: 241-253.

- Goenaga, A. L., Y. Zhou, et al. (2007). "Identification and characterization of tumor antigens by using antibody phage display and intrabody strategies." *Mol Immunol* 44(15): 3777-3788.
- Goh, A. M., C. R. Coffill, et al. (2011). "The role of mutant p53 in human cancer." *J Pathol* 223(2): 116-126.
- Goldman, E. R., G. P. Anderson, et al. (2008). "Thermostable llama single domain antibodies for detection of botulinum A neurotoxin complex." *Anal Chem* 80(22): 8583-8591.
- Gomez-Gualdron, D. A., J. C. Burgos, et al. (2011). "Carbon nanotubes: engineering biomedical applications." *Prog Mol Biol Transl Sci* 104: 175-245.
- Goozner, M. (2012). "Expanding Cancer Prevention and Treatment in the Developing World." *J Natl Cancer Inst.*
- Gourevitch, M. M., S. von Mensdorff-Pouilly, et al. (1995). "Polymorphic epithelial mucin (MUC-1)-containing circulating immune complexes in carcinoma patients." *Br J Cancer* 72(4): 934-938.
- Granowska, M., S. J. Mather, et al. (1990). "Radiolabelled stripped mucin, SM3, monoclonal antibody for immunoscintigraphy of ovarian tumours." *Int J Biol Markers* 5(2): 89-96.
- Grassi, J., C. Creminon, et al. (1996). "Two different approaches for developing immunometric assays of haptens." *Clin Chem* 42(9): 1532-1536.
- Greaves, M. and C. C. Maley (2012). "Clonal evolution in cancer." *Nature* 481(7381): 306-313.
- Green, N. M. (1975). "Avidin." *Adv Protein Chem* 29: 85-133.
- Green, N. M. (1990). "Avidin and streptavidin." *Methods Enzymol* 184: 51-67.
- Greenberg, A. S., D. Avila, et al. (1995). "A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks." *Nature* 374(6518): 168-173.
- Griffiths, A. D., M. Malmqvist, et al. (1993). "Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries." *EMBO J* 12(2): 725-734.
- Griffiths, A. D., S. C. Williams, et al. (1994). "Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires." *EMBO J* 13(14): 3245-3260.
- Grubor, N. M., R. Shinar, et al. (2004). "Novel biosensor chip for simultaneous detection of DNA-carcinogen adducts with low-temperature fluorescence." *Biosens Bioelectron* 19(6): 547-556.
- Guschin, D., G. Yershov, et al. (1997). "Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips." *Anal Biochem* 250(2): 203-211.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, et al. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." *Mol Cell Biol* 19(3): 1720-1730.
- Hamelinck, D., H. Zhou, et al. (2005). "Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling." *Mol Cell Proteomics* 4(6): 773-784.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, et al. (1993). "Naturally occurring antibodies devoid of light chains." *Nature* 363(6428): 446-448.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Harma, H., T. Soukka, et al. (2000). "Zeptomole detection sensitivity of prostate-specific antigen in a rapid microtitre plate assay using time-resolved fluorescence." *Luminescence* 15(6): 351-355.
- Harmer, V. (2011). "Breast awareness and screening." *Nurs Times* 107(25): 21-23.
- Harmsen, M. M., R. C. Ruuls, et al. (2000). "Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features." *Mol Immunol* 37(10): 579-590.

- Hayward, C. S., D. C. Knight, et al. (1997). "Effect of hormone replacement therapy on non-invasive cardiovascular haemodynamics." *J Hypertens* 15(9): 987-993.
- Hekim, C., J. Leinonen, et al. (2006). "Novel peptide inhibitors of human kallikrein 2." *J Biol Chem* 281(18): 12555-12560.
- Hilkens, J., F. Buijs, et al. (1984). "Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors." *Int J Cancer* 34(2): 197-206.
- Hinz, A., D. Lutje Hulsik, et al. (2010). "Crystal structure of the neutralizing Llama V(HH) D7 and its mode of HIV-1 gp120 interaction." *PLoS One* 5(5): e10482.
- Hirsch, B. R. and G. H. Lyman (2011). "Breast cancer screening with mammography." *Curr Oncol Rep* 13(1): 63-70.
- Hochschild, A. and S. L. Dove (1998). "Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription." *Cell* 92(5): 597-600.
- Hogbom, M., M. Eklund, et al. (2003). "Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3191-3196.
- Holz, C., A. Lueking, et al. (2001). "A human cDNA expression library in yeast enriched for open reading frames." *Genome Res* 11(10): 1730-1735.
- Homola, J. (2008). "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species." *Chem Rev* 108(2): 462-493.
- Hoogenboom, H. R., A. P. de Bruine, et al. (1998). "Antibody phage display technology and its applications." *Immunotechnology* 4(1): 1-20.
- Hoogenboom, H. R., A. D. Griffiths, et al. (1991). "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains." *Nucleic Acids Res* 19(15): 4133-4137.
- Hoogenboom, H. R. and G. Winter (1992). "By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro." *J Mol Biol* 227(2): 381-388.
- Horan, P. K. and L. L. Wheelless, Jr. (1977). "Quantitative single cell analysis and sorting." *Science* 198(4313): 149-157.
- Houseman, B. T., J. H. Huh, et al. (2002). "Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity." *Nat Biotechnol* 20(3): 270-274.
- Howard, J. H. and K. I. Bland (2012). "Current management and treatment strategies for breast cancer." *Curr Opin Obstet Gynecol* 24(1): 44-48.
- Huber, P. R., P. Bischof, et al. (1996). "CA 15-3: a multicentre evaluation of automated and manual tests." *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34(1): 77-84.
- Hudelist, G., M. Pacher-Zavisin, et al. (2004). "Use of high-throughput protein array for profiling of differentially expressed proteins in normal and malignant breast tissue." *Breast Cancer Res Treat* 86(3): 281-291.
- Hultberg, A., N. J. Temperton, et al. (2011). "Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules." *PLoS One* 6(4): e17665.
- Hunte, C. and H. Michel (2002). "Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments." *Curr Opin Struct Biol* 12(4): 503-508.
- Iakovlev, V. V., R. S. Goswami, et al. (2008). "Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR." *Breast Cancer Res Treat* 107(1): 145-154.
- Ibanez, L. I., M. De Filette, et al. (2011). "Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection." *J Infect Dis* 203(8): 1063-1072.
- Ikeda, H., K. Chamoto, et al. (2004). "The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy." *Cancer Sci* 95(9): 697-703.

- Ikeda, H., L. J. Old, et al. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2): 95-109.
- Iqbal, U., U. Trojahn, et al. (2010). "Kinetic analysis of novel mono- and multivalent VHH-fragments and their application for molecular imaging of brain tumours." *Br J Pharmacol* 160(4): 1016-1028.
- Janin, J. (1995). "Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics." *Biochimie* 77(7-8): 497-505.
- Johansen Taber, K. A., L. R. Morisy, et al. (2010). "Male breast cancer: risk factors, diagnosis, and management (Review)." *Oncol Rep* 24(5): 1115-1120.
- Johnsson, B., S. Lofas, et al. (1991). "Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors." *Anal Biochem* 198(2): 268-277.
- Joos, T. O., M. Schrenk, et al. (2000). "A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics." *Electrophoresis* 21(13): 2641-2650.
- Joung, J. K. (2001). "Identifying and modifying protein-DNA and protein-protein interactions using a bacterial two-hybrid selection system." *J Cell Biochem Suppl* 37: 53-57.
- Joyce, J. A., P. Laakkonen, et al. (2003). "Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis." *Cancer Cell* 4(5): 393-403.
- Kallioniemi, O. P., U. Wagner, et al. (2001). "Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer." *Hum Mol Genet* 10(7): 657-662.
- Kamangar, F., G. M. Dores, et al. (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world." *J Clin Oncol* 24(14): 2137-2150.
- Kehoe, J. W. and B. K. Kay (2005). "Filamentous phage display in the new millennium." *Chem Rev* 105(11): 4056-4072.
- Kiewitz, A. and H. Wolfes (1997). "Mapping of protein-protein interactions between c-myc and its coactivator CBP by a new phage display technique." *FEBS Lett* 415(3): 258-262.
- Kim, S. H., A. Tamrazi, et al. (2005). "A proteomic microarray approach for exploring ligand-initiated nuclear hormone receptor pharmacology, receptor selectivity, and heterodimer functionality." *Mol Cell Proteomics* 4(3): 267-277.
- Kobayashi, N., H. Oyama, et al. (2009). "'Cleavable' hapten-biotin conjugates: preparation and use for the generation of anti-steroid single-domain antibody fragments." *Anal Biochem* 387(2): 257-266.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256(5517): 495-497.
- Kolonin, M., R. Pasqualini, et al. (2001). "Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy." *Curr Opin Chem Biol* 5(3): 308-313.
- Kononen, J., L. Bubendorf, et al. (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." *Nat Med* 4(7): 844-847.
- Korkaya, H., S. Liu, et al. (2011). "Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment." *J Clin Invest* 121(10): 3804-3809.
- Korotkov, K. V., E. Pardon, et al. (2009). "Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody." *Structure* 17(2): 255-265.
- Kowalewska, M., M. Chechlińska, et al. (2006). "The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes." *Eur J Cancer* 42(16): 2671-2674.
- Krebber, C., S. Spada, et al. (1997). "Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein-ligand interactions." *J Mol Biol* 268(3): 607-618.

- Krebs, B., R. Rauchenberger, et al. (2001). "High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies." *J Immunol Methods* 254(1-2): 67-84.
- Kristensen, P. and G. Winter (1998). "Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages." *Fold Des* 3(5): 321-328.
- Krupey, J., P. Gold, et al. (1968). "Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigens of the human digestive system." *J Exp Med* 128(3): 387-398.
- Kubetzko, S., E. Balic, et al. (2006). "PEGylation and multimerization of the anti-p185HER-2 single chain Fv fragment 4D5: effects on tumor targeting." *J Biol Chem* 281(46): 35186-35201.
- Kufe, D., G. Inghirami, et al. (1984). "Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors." *Hybridoma* 3(3): 223-232.
- Kusnezow, W., A. Jacob, et al. (2003). "Antibody microarrays: an evaluation of production parameters." *Proteomics* 3(3): 254-264.
- Ladenson, R. C., D. L. Crimmins, et al. (2006). "Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment." *Anal Chem* 78(13): 4501-4508.
- Lam, A. Y., E. Pardon, et al. (2009). "Nanobody-aided structure determination of the EpsI:EpsJ pseudopilin heterodimer from *Vibrio vulnificus*." *J Struct Biol* 166(1): 8-15.
- Lambrechts, A. C., A. J. Bosma, et al. (1999). "Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 56(3): 219-231.
- Launoy, G. (2010). "[Epidemiology of cancers in France]." *Rev Prat* 60(2): 178-182.
- Lauwereys, M., M. Arbabi Ghahroudi, et al. (1998). "Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies." *EMBO J* 17(13): 3512-3520.
- Lay, C. L., J. Liu, et al. (2011). "Functionalized carbon nanotubes for anticancer drug delivery." *Expert Rev Med Devices* 8(5): 561-566.
- Lee, C. M., N. Iorno, et al. (2007). "Selection of human antibody fragments by phage display." *Nat Protoc* 2(11): 3001-3008.
- Lee, H. H., C. A. Lim, et al. (2012). "Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer." *Int J Biol Sci* 8(3): 353-362.
- Lee, Y., D. K. Kang, et al. (2004). "High-throughput screening of novel peptide inhibitors of an integrin receptor from the hexapeptide library by using a protein microarray chip." *J Biomol Screen* 9(8): 687-694.
- Levitt, N. C. and I. D. Hickson (2002). "Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity." *Trends Mol Med* 8(4): 179-186.
- Li, W. and N. B. Caberoy (2010). "New perspective for phage display as an efficient and versatile technology of functional proteomics." *Appl Microbiol Biotechnol* 85(4): 909-919.
- Lianidou, E. S. and A. Markou (2011). "Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges." *Clin Chem* 57(9): 1242-1255.
- Lin, Y., R. Huang, et al. (2004). "Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays." *Int J Cancer* 109(4): 507-515.
- Ling, C. M. and L. R. Overby (1972). "Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with ¹²⁵I-antibody." *J Immunol* 109(4): 834-841.
- Lipovsek, D., S. M. Lippow, et al. (2007). "Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies." *J Mol Biol* 368(4): 1024-1041.

- Loi, S., B. Haibe-Kains, et al. (2007). "Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade." *J Clin Oncol* 25(10): 1239-1246.
- Loris, R., I. Marianovsky, et al. (2003). "Crystal structure of the intrinsically flexible addiction antidote MazE." *J Biol Chem* 278(30): 28252-28257.
- Lou, J., R. Marzari, et al. (2001). "Antibodies in haystacks: how selection strategy influences the outcome of selection from molecular diversity libraries." *J Immunol Methods* 253(1-2): 233-242.
- Lugli, A., L. Tornillo, et al. (2004). "Hepatocyte paraffin 1 expression in human normal and neoplastic tissues: tissue microarray analysis on 3,940 tissue samples." *Am J Clin Pathol* 122(5): 721-727.
- MacBeath, G. and S. L. Schreiber (2000). "Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination." *Science* 289(5485): 1760-1763.
- Maric, P., P. Ozretic, et al. (2011). "Tumor markers in breast cancer--evaluation of their clinical usefulness." *Coll Antropol* 35(1): 241-247.
- Martinez Guisado, A., A. Sanchez Munoz, et al. (2011). "Initialization of adjuvant hormonal treatment for breast cancer." *Adv Ther* 28 Suppl 6: 66-84.
- Matthews, D. J. and J. A. Wells (1993). "Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display." *Science* 260(5111): 1113-1117.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." *Nature* 348(6301): 552-554.
- McNeil, C. (1998). "Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer." *J Natl Cancer Inst* 90(12): 882-883.
- McPhee, S. J. (1995). "Screening for cancer. Useful despite its limitations." *West J Med* 163(2): 169-172.
- Meenakshi, A., R. S. Kumar, et al. (2002). "ELISA for quantitation of serum C-erbB-2 oncoprotein in breast cancer patients." *J Immunoassay Immunochem* 23(3): 293-305.
- Mezzasoma, L., T. Bacarese-Hamilton, et al. (2002). "Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases." *Clin Chem* 48(1): 121-130.
- Miles, L. E. and C. N. Hales (1968). "Immunoradiometric assay of human growth hormone." *Lancet* 2(7566): 492-493.
- Miller, T. W. and A. Messer (2005). "Intrabody applications in neurological disorders: progress and future prospects." *Mol Ther* 12(3): 394-401.
- Moadel, R. M. (2011). "Breast cancer imaging devices." *Semin Nucl Med* 41(3): 229-241.
- Monticciolo, D. L. (2011). "Magnetic resonance imaging of the breast for cancer diagnosis and staging." *Semin Ultrasound CT MR* 32(4): 319-330.
- Morgan, E., R. Varro, et al. (2004). "Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology." *Clin Immunol* 110(3): 252-266.
- Murphy, L. C. and P. Watson (2002). "Steroid receptors in human breast tumorigenesis and breast cancer progression." *Biomed Pharmacother* 56(2): 65-77.
- Muyldermans, S., T. Atarhouch, et al. (1994). "Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains." *Protein Eng* 7(9): 1129-1135.
- Nakata, B., Y. Ogawa, et al. (2000). "Serum CYFRA 21-1 is one of the most reliable tumor markers for breast carcinoma." *Cancer* 89(6): 1285-1290.
- Namer, M., A. Ramaioli, et al. (1998). "[Prognostic factors and therapeutic strategy of breast cancer]." *Rev Prat* 48(1): 45-51.
- Nathan, C. O., P. Carter, et al. (1997). "Elevated expression of eIF4E and FGF-2 isoforms during vascularization of breast carcinomas." *Oncogene* 15(9): 1087-1094.

- Neuman de Vegvar, H. E., R. R. Amara, et al. (2003). "Microarray profiling of antibody responses against simian-human immunodeficiency virus: postchallenge convergence of reactivities independent of host histocompatibility type and vaccine regimen." *J Virol* 77(20): 11125-11138.
- Neve, R. M., H. A. Lane, et al. (2001). "The role of overexpressed HER2 in transformation." *Ann Oncol* 12 Suppl 1: S9-13.
- Nguyen, V. K., R. Hamers, et al. (1999). "Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies." *Mol Immunol* 36(8): 515-524.
- Nomura, T. and N. Katunuma (2005). "Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells." *J Med Invest* 52(1-2): 1-9.
- Oakman, C., E. Moretti, et al. (2011). "Triple negative breast cancer: a heterogeneous subgroup defined by what it is not." *Eur J Cancer* 47 Suppl 3: S370-372.
- Olichon, A., D. Schweizer, et al. (2007). "Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains." *BMC Biotechnol* 7: 7.
- Olsson, H. (2000). "Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis." *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5): 345-350.
- Padlan, E. A. (1994). "Anatomy of the antibody molecule." *Mol Immunol* 31(3): 169-217.
- Pallud, C., J. M. Guinebriere, et al. (2005). "Tissue expression and serum levels of the oncoprotein HER-2/neu in 157 primary breast tumours." *Anticancer Res* 25(2B): 1433-1440.
- Pandey, A. and M. Mann (2000). "Proteomics to study genes and genomes." *Nature* 405(6788): 837-846.
- Parmley, S. F. and G. P. Smith (1988). "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes." *Gene* 73(2): 305-318.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." *Nature* 380(6572): 364-366.
- Pelizzola, D., E. Bombardieri, et al. (1995). "How alternative are immunoassay systems employing non-radioisotopic labels? A comparative appraisal of their main analytical characteristics." *Q J Nucl Med* 39(4): 251-263.
- Peluso, P., D. S. Wilson, et al. (2003). "Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays." *Anal Biochem* 312(2): 113-124.
- Perashad, K., J. D. Pavlovic, et al. (2010). "Generating a panel of highly specific antibodies to 20 human SH2 domains by phage display." *Protein Eng Des Sel* 23(4): 279-288.
- Peterson, E., S. M. Owens, et al. (2006). "Monoclonal antibody form and function: manufacturing the right antibodies for treating drug abuse." *AAPS J* 8(2): E383-390.
- Philibert, P., A. Stoessel, et al. (2007). "A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm." *BMC Biotechnol* 7: 81.
- Pichon, M. F., K. Hacene, et al. (2004). "Serum HER-2 extracellular domain (ECD) before the first metastasis in 128 breast cancer patients." *Clin Lab* 50(3-4): 163-170.
- Pierga, J. Y., F. C. Bidard, et al. (2007). "Prognostic value of peripheral blood double detection of CK19 and MUC1 mRNA positive cells detected by RT-quantitative PCR in 94 breast cancer patients with a follow up of 9 years." *Mol Oncol* 1(3): 267-268.
- Piliarik, M. and J. Homola (2009). "Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits?" *Opt Express* 17(19): 16505-16517.
- Pinaud, F., X. Michalet, et al. (2006). "Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes." *Biomaterials* 27(9): 1679-1687.
- Poetz, O., R. Ostendorp, et al. (2005). "Protein microarrays for antibody profiling: specificity and affinity determination on a chip." *Proteomics* 5(9): 2402-2411.

- Ponsard, I., M. Galleni, et al. (2001). "Selection of metalloenzymes by catalytic activity using phage display and catalytic elution." *Chembiochem* 2(4): 253-259.
- Porter, R. R. (1959). "The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain." *Biochem J* 73: 119-126.
- Poynter, J. N., B. Langholz, et al. (2010). "Reproductive factors and risk of contralateral breast cancer by BRCA1 and BRCA2 mutation status: results from the WECARE study." *Cancer Causes Control* 21(6): 839-846.
- Quezada, S. A., K. S. Peggs, et al. (2011). "Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication." *Immunol Rev* 241(1): 104-118.
- Quinn, J. G., S. O'Neill, et al. (2000). "Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions." *Anal Biochem* 281(2): 135-143.
- Rakha, E. A. and I. O. Ellis (2011). "Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics." *Adv Anat Pathol* 18(4): 255-267.
- Ramachandran, N., D. N. Larson, et al. (2005). "Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays." *FEBS J* 272(21): 5412-5425.
- Ramaswamy, S. and C. M. Perou (2003). "DNA microarrays in breast cancer: the promise of personalised medicine." *Lancet* 361(9369): 1576-1577.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, et al. (2011). "Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor." *Nature* 469(7329): 175-180.
- Reis, L. O., F. G. Dias, et al. (2011). "Male breast cancer." *Aging Male* 14(2): 99-109.
- Reiter, Y., U. Brinkmann, et al. (1996). "Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments." *Nat Biotechnol* 14(10): 1239-1245.
- Riechmann, L. and S. Muyldermans (1999). "Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains." *J Immunol Methods* 231(1-2): 25-38.
- Riethdorf, S., H. Fritsche, et al. (2007). "Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system." *Clin Cancer Res* 13(3): 920-928.
- Rifai, N., M. A. Gillette, et al. (2006). "Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility." *Nat Biotechnol* 24(8): 971-983.
- Ring, A., I. E. Smith, et al. (2004). "Circulating tumour cells in breast cancer." *Lancet Oncol* 5(2): 79-88.
- Robinson, W. H., C. DiGennaro, et al. (2002). "Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses." *Nat Med* 8(3): 295-301.
- Rondot, S., J. Koch, et al. (2001). "A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display." *Nat Biotechnol* 19(1): 75-78.
- Roovers, R. C., T. Laeremans, et al. (2007). "Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies." *Cancer Immunol Immunother* 56(3): 303-317.
- Rosen, E. M., S. Fan, et al. (2003). "BRCA1 gene in breast cancer." *J Cell Physiol* 196(1): 19-41.
- Rubin, H. (1997). "Cell aging in vivo and in vitro." *Mech Ageing Dev* 98(1): 1-35.
- Rubina, A. Y., E. I. Dementieva, et al. (2003). "Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications." *Biotechniques* 34(5): 1008-1014, 1016-1020, 1022.
- Ruiz-Taylor, L. A., T. L. Martin, et al. (2001). "Monolayers of derivatized poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) on metal oxides as a class of biomolecular interfaces." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3): 852-857.
- Saghatchian, M., S. Guepratte, et al. (2004). "Serum HER-2 extracellular domain: relationship with clinicobiological presentation and prognostic value before and after primary treatment in 701 breast cancer patients." *Int J Biol Markers* 19(1): 14-22.

- Sakanyan, V. (2005). "High-throughput and multiplexed protein array technology: protein-DNA and protein-protein interactions." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815(1-2): 77-95.
- Sanchez-Carbayo, M. (2006). "Antibody arrays: technical considerations and clinical applications in cancer." *Clin Chem* 52(9): 1651-1659.
- Sanchez-Carbayo, M., N. D. Socci, et al. (2006). "Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays." *Am J Pathol* 168(1): 93-103.
- Schena, M., R. A. Heller, et al. (1998). "Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics." *Trends Biotechnol* 16(7): 301-306.
- Schmidt, M., M. Gehrmann, et al. (2010). "New prognostic and predictive factors in breast cancer." *Minerva Ginecol* 62(6): 599-611.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* 331(6024): 1565-1570.
- Schulte, I., H. Tammen, et al. (2005). "Peptides in body fluids and tissues as markers of disease." *Expert Rev Mol Diagn* 5(2): 145-157.
- Scott, J. K. and G. P. Smith (1990). "Searching for peptide ligands with an epitope library." *Science* 249(4967): 386-390.
- Seehaus, T., F. Breitling, et al. (1992). "A vector for the removal of deletion mutants from antibody libraries." *Gene* 114(2): 235-237.
- Seregini, E., A. Coli, et al. (2004). "Circulating tumour markers in breast cancer." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31 Suppl 1: S15-22.
- Seurynck-Servoss, S. L., A. M. White, et al. (2007). "Evaluation of surface chemistries for antibody microarrays." *Anal Biochem* 371(1): 105-115.
- Sheedy, C., K. Y. Yau, et al. (2006). "Selection, characterization, and CDR shuffling of naive llama single-domain antibodies selected against auxin and their cross-reactivity with auxinic herbicides from four chemical families." *J Agric Food Chem* 54(10): 3668-3678.
- Shibasaki, S., H. Maeda, et al. (2009). "Molecular display technology using yeast--arming technology." *Anal Sci* 25(1): 41-49.
- Shukla, A. A., B. Hubbard, et al. (2007). "Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848(1): 28-39.
- Sias, P. E., C. E. Kotts, et al. (1990). "ELISA for quantitation of the extracellular domain of p185HER2 in biological fluids." *J Immunol Methods* 132(1): 73-80.
- Skaane, P. (2009). "Studies comparing screen-film mammography and full-field digital mammography in breast cancer screening: updated review." *Acta Radiol* 50(1): 3-14.
- Sliwowska, I., Z. Kopczyński, et al. (2006). "Diagnostic value of measuring serum CA 15-3, TPA, and TPS in women with breast cancer." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 60: 295-299.
- Smith, B. M., M. J. Slade, et al. (2000). "Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques." *J Clin Oncol* 18(7): 1432-1439.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228(4705): 1315-1317.
- Smith, L., M. B. Watson, et al. (2006). "The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays." *Mol Cancer Ther* 5(8): 2115-2120.
- Soria, J. C., L. R. Gauthier, et al. (1999). "Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients." *Clin Cancer Res* 5(5): 971-975.

- Soultani-Vigneron, S., V. Dugas, et al. (2005). "Immobilisation of oligo-peptidic probes for microarray implementation: characterisation by FTIR, atomic force microscopy and 2D fluorescence." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 822(1-2): 304-310.
- Speyer, C. L., J. S. Smith, et al. (2011). "Metabotropic glutamate receptor-1: a potential therapeutic target for the treatment of breast cancer." *Breast Cancer Res Treat*.
- Stijlemans, B., K. Conrath, et al. (2004). "Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm." *J Biol Chem* 279(2): 1256-1261.
- Stone, E., T. Hiram, et al. (2007). "The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules." *J Immunol Methods* 318(1-2): 88-94.
- Su, C., V. K. Nguyen, et al. (2002). "Adaptive evolution of variable region genes encoding an unusual type of immunoglobulin in camelids." *Mol Biol Evol* 19(3): 205-215.
- Sun, Y., G. S. Shukla, et al. (2009). "Phage-display selection on tumor histological specimens with laser capture microdissection." *J Immunol Methods* 347(1-2): 46-53.
- Sun, Y. F., X. R. Yang, et al. (2011). "Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance." *J Cancer Res Clin Oncol* 137(8): 1151-1173.
- Tabet, J. C. and S. Rebuffat (2003). "[Nobel Prize 2002 for chemistry: mass spectrometry and nuclear magnetic resonance]." *Med Sci (Paris)* 19(8-9): 865-872.
- Tanaka, T., M. N. Lobato, et al. (2003). "Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies." *J Mol Biol* 331(5): 1109-1120.
- Teboul, M. (2010). "Advantages of Ductal Echography (DE) over conventional breast investigation in the diagnosis of breast malignancies." *Med Ultrason* 12(1): 32-42.
- Tereshko, V., S. Uysal, et al. (2008). "Toward chaperone-assisted crystallography: protein engineering enhancement of crystal packing and X-ray phasing capabilities of a camelid single-domain antibody (VHH) scaffold." *Protein Sci* 17(7): 1175-1187.
- Tijink, B. M., T. Laeremans, et al. (2008). "Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology." *Mol Cancer Ther* 7(8): 2288-2297.
- Turunen, L., K. Takkinen, et al. (2009). "Automated panning and screening procedure on microplates for antibody generation from phage display libraries." *J Biomol Screen* 14(3): 282-293.
- van der Linden, R., B. de Geus, et al. (2000). "Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama." *J Immunol Methods* 240(1-2): 185-195.
- van der Vaart, J. M., N. Pant, et al. (2006). "Reduction in morbidity of rotavirus induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments." *Vaccine* 24(19): 4130-4137.
- van Heemst, D., P. M. den Reijer, et al. (2007). "Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers." *Eur J Cancer* 43(15): 2144-2152.
- van Regenmortel, M. H. (2000). "The recognition of proteins and peptides by antibodies." *J Immunoassay* 21(2-3): 85-108.
- Vanwetswinkel, S., B. Avalle, et al. (2000). "Selection of beta-lactamases and penicillin binding mutants from a library of phage displayed TEM-1 beta-lactamase randomly mutated in the active site omega-loop." *J Mol Biol* 295(3): 527-540.
- Vazquez-Martin, A., R. Colomer, et al. (2007). "Protein array technology to detect HER2 (erbB-2)-induced 'cytokine signature' in breast cancer." *Eur J Cancer* 43(7): 1117-1124.
- Vercruyse, T., E. Pardon, et al. (2010). "An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production." *J Biol Chem* 285(28): 21768-21780.
- Verhaert, R. M., J. Beekwilder, et al. (2002). "Phage display selects for amylases with improved low pH starch-binding." *J Biotechnol* 96(1): 103-118.

- Verma, R., E. Boleti, et al. (1998). "Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems." *J Immunol Methods* 216(1-2): 165-181.
- Vielemeyer, O., C. Nizak, et al. (2010). "Characterization of single chain antibody targets through yeast two hybrid." *BMC Biotechnol* 10: 59.
- Viguier, J. (2011). "Cancer screening: more information, more action, more benefits." *Eur J Cancer Prev* 20 Suppl 1: S2-4.
- Vincke, C., R. Loris, et al. (2009). "General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold." *J Biol Chem* 284(5): 3273-3284.
- Vona, G., A. Sabile, et al. (2000). "Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells." *Am J Pathol* 156(1): 57-63.
- Voss, M., M. Lettau, et al. (2009). "Identification of SH3 domain interaction partners of human FasL (CD178) by phage display screening." *BMC Immunol* 10: 53.
- Wang, H. and R. Liu (2011). "Advantages of mRNA display selections over other selection techniques for investigation of protein-protein interactions." *Expert Rev Proteomics* 8(3): 335-346.
- Ward, E. M., M. J. Thun, et al. (2006). "Interpreting cancer trends." *Ann N Y Acad Sci* 1076: 29-53.
- Ward, E. S., D. Gussow, et al. (1989). "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*." *Nature* 341(6242): 544-546.
- Watson, M. A. and T. P. Fleming (1994). "Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer." *Cancer Res* 54(17): 4598-4602.
- Watson, M. A. and T. P. Fleming (1996). "Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer." *Cancer Res* 56(4): 860-865.
- Wei, E. K., K. Y. Wolin, et al. (2010). "Time course of risk factors in cancer etiology and progression." *J Clin Oncol* 28(26): 4052-4057.
- West, J. L. and N. J. Halas (2003). "Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics." *Annu Rev Biomed Eng* 5: 285-292.
- Wide, L., H. Bennich, et al. (1967). "Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies." *Lancet* 2(7526): 1105-1107.
- Wingren, C. and C. A. Borrebaeck (2008). "Antibody microarray analysis of directly labelled complex proteomes." *Curr Opin Biotechnol* 19(1): 55-61.
- Winter, G., A. D. Griffiths, et al. (1994). "Making antibodies by phage display technology." *Annu Rev Immunol* 12: 433-455.
- Wodicka, L., H. Dong, et al. (1997). "Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nat Biotechnol* 15(13): 1359-1367.
- Wong, N. S., H. J. Kahn, et al. (2006). "Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients." *Breast Cancer Res Treat* 99(1): 63-69.
- Worn, A. and A. Pluckthun (2001). "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments." *J Mol Biol* 305(5): 989-1010.
- Wu, A. W., J. Gu, et al. (2003). "Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis." *World J Gastroenterol* 9(9): 1990-1994.
- Wu, M., Y. J. Park, et al. (2011). "Structures of a key interaction protein from the *Trypanosoma brucei* editosome in complex with single domain antibodies." *J Struct Biol* 174(1): 124-136.
- Xiao, N., X. Zhang, et al. (2006). "Isolation and identification of a novel WSSV nucleocapsid protein by cDNA phage display using an scFv antibody." *J Virol Methods* 137(2): 272-279.

- Yalow, R. S. and S. A. Berson (1959). "Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods." *Nature* 184 (Suppl 21): 1648-1649.
- Yalow, R. S. and S. A. Berson (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man." *J Clin Invest* 39: 1157-1175.
- Yan, X. and Z. Xu (2006). "Ribosome-display technology: applications for directed evolution of functional proteins." *Drug Discov Today* 11(19-20): 911-916.
- Yang, J. Y., C. S. Zong, et al. (2006). "MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation." *Mol Cell Biol* 26(19): 7269-7282.
- Yang, W. T. (2011). "Emerging techniques and molecular imaging in breast cancer." *Semin Ultrasound CT MR* 32(4): 288-299.
- Yau, K. Y., M. A. Groves, et al. (2003). "Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library." *J Immunol Methods* 281(1-2): 161-175.
- Zhang, J., J. Tanha, et al. (2004). "Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents." *J Mol Biol* 335(1): 49-56.
- Zhang, M. Y. and D. S. Dimitrov (2009). "Sequential antigen panning for selection of broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal antibodies." *Methods Mol Biol* 562: 143-154.
- Zhou, Y. and J. D. Marks (2009). "Identification of target and function specific antibodies for effective drug delivery." *Methods Mol Biol* 525: 145-160, xv.
- Zhu, H., M. Bilgin, et al. (2001). "Global analysis of protein activities using proteome chips." *Science* 293(5537): 2101-2105.
- Zhu, H., J. F. Klemic, et al. (2000). "Analysis of yeast protein kinases using protein chips." *Nat Genet* 26(3): 283-289.
- Zhu, H. and M. Snyder (2003). "Protein chip technology." *Curr Opin Chem Biol* 7(1): 55-63.
- Zieglschmid, V., C. Hollmann, et al. (2005). "Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells." *Anticancer Res* 25(3A): 1803-1810.