

UE11- Parcours Biologie – Cours n°10 16/01/2019 Pr. Magali COURT magali.maizi@inserm.fr	RT : Itokiana Razafinjato & Olivier Reuge RL : Delphine Rault
---	---

Découverte et évaluation de biomarqueurs de pathologie par des méthodes protéomiques

Partie 1 : Bases de la protéomique

- I. Introduction à la protéomiques**
 - A- Du génome au protéome
 - B- Développements technologiques
 - C- Identification des protéines
 - D- Quantification des protéines
- II. Protéines biomarqueurs de pathologies**
 - A- Définition
 - B- Stratégies protéomiques

Partie 2 : Application en recherches et exemples

- I. Stratégies protéomiques préalables**
 - A- Optimisation de la collecte et de la préparation
 - B- Bases de données et protéomes identifiables
- II. Découverte et évaluation des biomarqueurs urinaires**
 - A- Phase de découverte
 - B- Phase d'évaluation

Partie 1 : Bases de la protéomique

I- Introduction à la protéomique

A- Du génome au protéome

La **protéomique** désigne :

- **L'étude des protéines** d'un système biologique donné dans des conditions physiologiques et environnementales spécifiques
- C'est l'**identification**, la **quantification**, la **localisation** et/ou la **caractérisation** des protéines d'un système biologique dans des conditions définies (le protéome évolue en fonction de l'environnement de ces conditions)
- Elle permet la **comparaison** des protéines d'un système biologique dans plusieurs conditions (par exemple un environnement sain versus des conditions pathologique).

Les **protéines** sont des chaînes polymériques d'acides aminés, présentes dans tous les organismes vivants. Elles accomplissent une large variété de fonctions essentielles : catalyse enzymatique, transport et stockage, structure et mouvement, protection immunitaire, croissance et différenciation,...

Du gène à la protéine :

Le passage du gène à la protéine comprend les étapes de transcription, traduction et modifications post-traductionnelles

Passer de l'alphabet de 4 acides nucléiques à celui de 20 acides aminés implique une **redondance** dans le code génétique : plusieurs codons peuvent donner un même acide aminé. Ainsi la séquence protéique est parfois insensible au polymorphisme du gène.

Plusieurs effets font qu'**un gène code pour plusieurs protéines** :

- Transcription : polymorphismes, des glissements de cadre de lecture, des gènes imbriqués
- Traduction : épissage alternatif, recodage, initiation interne, trans-lecture
- Post-traduction : activation, modifications post-traductionnelles

Ainsi, à partir d'un génome qui comprend environ 20 000 gènes, on arrive à environ 1 million de protéoformes (=protéines). C'est l'ensemble de ces protéines qu'on va vouloir identifier et étudier dans plusieurs états.

B- Développements technologiques

➤ Electrophorèse bidimensionnelle :

C'est la première technique de spectrométrie de masse utilisée. Elle sépare les protéines selon leur point isoélectrique (pHi, axe des abscisses) et leur poids moléculaire apparent (axe des ordonnées).

La révélation par coloration au nitrate d'argent a une sensibilité supérieure (0.02µg) au bleu de Coomassie (0.1µg) qui permet néanmoins d'identifier la protéine par spectrométrie de masse.

Chaque spot représente une protéine et donc, on peut avoir sur un ensemble de poids moléculaire à des pH différents une protéine sous différents états.

On peut détecter environ un millier de protéine.

Limite: les protéines très hydrophobes ou de poids moléculaire extrême sont difficilement détectables, et se perdent lors de la précipitation.

➤ Séquençage d'Edman

- 1- Réaction entre les amines primaires et le phenyl iosthiocyanate
- 2- Clivage séquentiel de l'AA en N-ter de la protéine
- 3- Identification de l'AA libéré par spectrométrie de masse.

Limites :

- Un cycle dure deux heures
- 50 résidus/protéine maximum peuvent être détectés
- Une protéine est séquencée en une journée : le débit est bas.

➤ Spectrométrie de masse

La plus utilisée actuellement. Cette méthode mesure le **rapport masse / charge (m/z)** d'une protéine chargée (ion) à l'aide de champs électriques et magnétiques.

A la fin des années 80 sont donc apparues des méthodes d'ionisation douces de composés biologiques comme l'**électrospray** (échantillon en solution sous pression atmosphérique), ou la **désorption/ionisation laser assistée par matrice** (échantillon co-cristallisé sur plaque métallique, avec une matrice, sous vide).

Figure 1

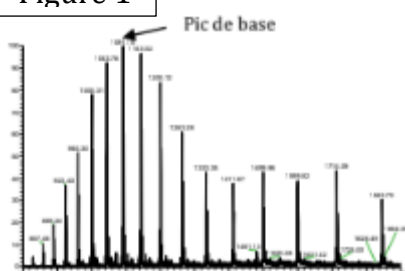
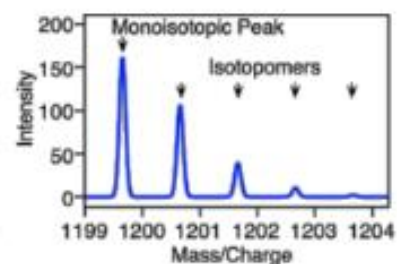


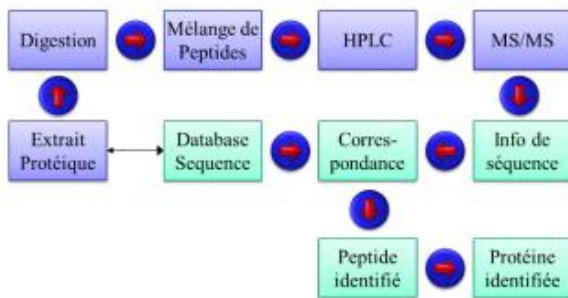
Figure 2



(1) MS d'une protéine : chaque pic correspond à un peptide. Peptide d'intensité maximale = Pic de base

2) Zoom MS du pic de base : massif isotopique dont chaque pic correspond à un isotope. Le premier pic d'intensité maximale correspond à la masse monoisotopique, celle de l'isotope le plus stable (C12). Le deuxième serait alors C13, et ainsi de suite.

C- Identification des protéines

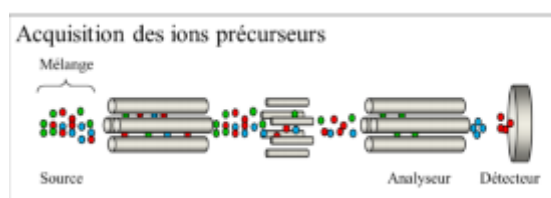


A partir d'un extrait cellulaire ou protéique, les protéines sont séparées par SDS-PAGE sur gel monodimensionnel coloré à l'argent, dont on va couper la bande correspondant à la protéine d'intérêt. La **digestion trypsique** de la protéine libère alors différents peptides.

- Après séparation par **chromatographie liquide** puis **ionisation électrospray**, ces peptides sont analysés par **spectre MS/MS** dont les informations séquentielles sont confrontées aux **bases de données**, afin d'identifier la **séquence** du peptide, puis celle de la protéine et enfin leur **quantité**.

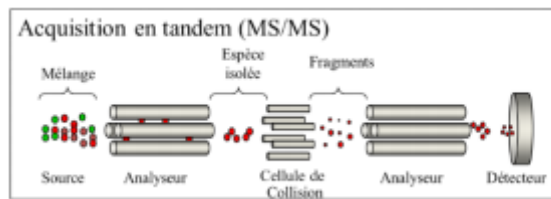
- Digestion trypsique** : la trypsine coupe après les **lysines** et les **arginines**. Ce clivage peut se réaliser sur un gel unidimensionnel, un spot bidimensionnel ou encore en solution.
- Chromatographie liquide** : séparant par gradient les différents peptides de l'échantillon. Les peptides hydrophiles sortent en premiers et les peptides hydrophobes sortent en derniers. Au fur et à mesure de l'élution, les peptides vont rentrer dans le spectromètre de masse et va permettre de réaliser un chromatogramme.
- Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)** : permet d'obtenir les informations sur la séquence.

Acquisition des ions précurseurs : analyse d'un peptide



Le 1^{er} quadrupole sélectionne les peptides doublement/triplement chargés ; ensuite on a un octapole (guidaillon) et enfin le dernier quadrupole qui permet d'analyser et de diriger les peptides vers le détecteur.

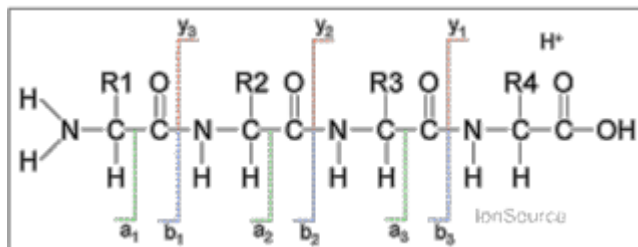
Acquisition en tandem (MS/MS) : identification d'un fragment du peptide



Au niveau de l'octapole (cellule de collision), on va appliquer une tension et introduire un gaz qui va permettre de fragmenter le peptide isolé et permettre de l'analyser par la suite.

Dissociation des peptides

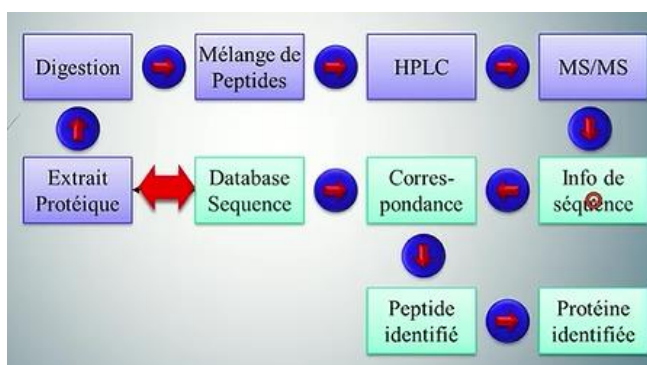
Les peptides fragmentent préférentiellement par dissociation des liaisons **les plus fragiles** du squelette peptidique. Il est ainsi possible de prédire les fragments d'un peptide sur la base de sa séquence en acides aminés.



✓ Exemple de l'angiotensine :

Le peptide a une masse de 1045, tandis que le pic monoisotopique du spectre ci-contre est diminué de moitié à 523.77: le peptide est 2 fois chargé, ce qui divise le rapport m/z par 2.

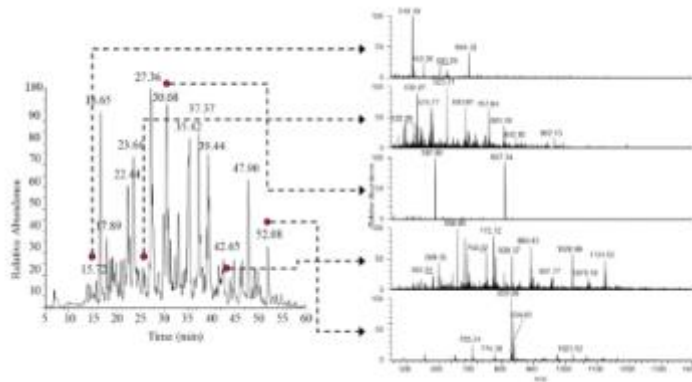
Identification en base de données de séquences



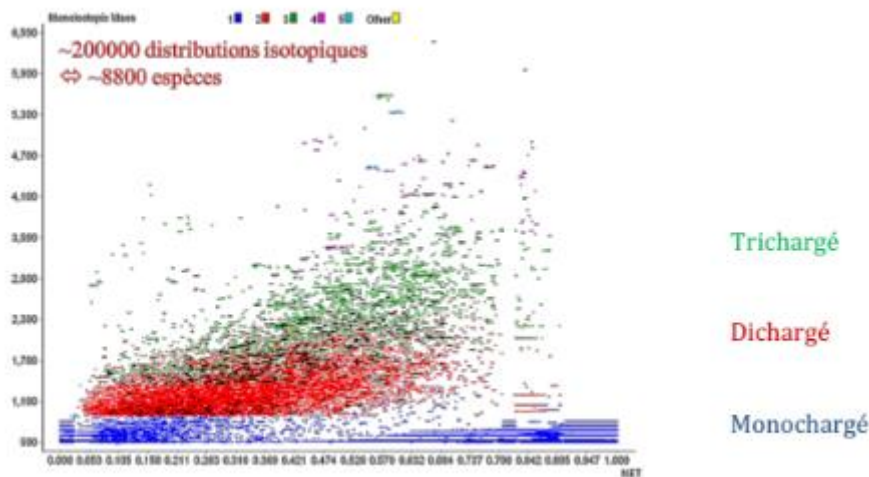
Afin d'identifier la protéine, il faut que sa séquence soit connue et figure dans la base de données. Les masses expérimentales MS/MS des peptides sont comparées aux masses théoriques calculées. On procède de même pour les fragments.

Complexité de l'échantillon

Chromatogramme en ion total : la spectrométrie de masse prend le peptide le plus intense, le fragmente pour obtenir le spectre MS/MS, et va faire la même chose pour le prochain. On travaille en général sur des fluides ou des tissus, les chromatogrammes présentent de très nombreux peptides au cours du temps.



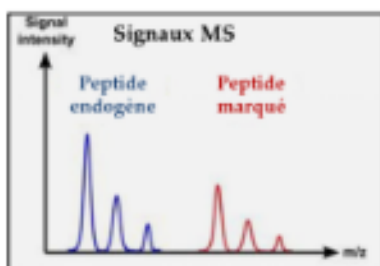
Carte peptidique (masse en fonction du temps de rétention) : chaque point représente une distribution isotopique. La détection n'implique pas forcément l'identification ou la quantification.



D- Quantification des protéines

L'analyse des peptides n'est pas intrinsèquement quantitative. En effet, tous les peptides d'une même protéine ne génèrent pas le même signal (courant ionique). Néanmoins, le signal d'un peptide donné est proportionnel à sa concentration. L'intensité est variable en fonction de la facilité ou pas d'ionisation de ce peptide et de ces caractéristiques physicochimiques.

- **Dilution isotopique**



Pour faire de la quantification, on utilise des peptides marqués (marquage des peptides avec un isotope lourd) pour ensuite comparer sa concentration (connue) avec celle des peptides endogènes. Leur rapport m/z étant différent, on a donc un décalage du pic par rapport au peptide endogène.

▪ Approches comparatives

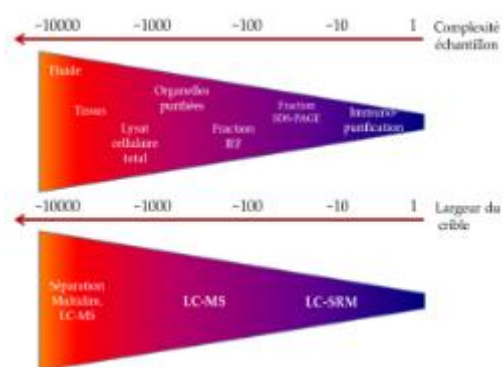
Permet de comparer deux échantillons : soit par marquage isotopique différentiel, puis mélange avant analyse (signaux paires), soit par analyse directe de chaque échantillon sans marquage puis comparaison des signaux.

▪ Approches quantitatives

- ✓ **SRM** : quantifier un peptide ciblé d'une protéine connue. Il s'agit d'une quantification par addition de standard interne isotopiquement alourdi. On va isoler dans le premier quadropole le peptide, le fragmenter et suivre l'intensité de certains fragments qui sont connus et les plus intenses.

La SRM est spécifique et sensible : le précurseur et son fragment sont sélectionnés, et la détection se focalise sur un seul peptide.

✓ Protéomique globale ou ciblée ?



Dans les fluides, on est dans les 10 000 protéines, par contre quand on est dans les tissus, les organelles purifiées, les fractions de SDS-PAGE ou encore les immuno-purifications, on diminue la complexité donc le nombre de protéines dans l'échantillon à analyser.

Donc, à 10000, on va plutôt utiliser la séparation multidimensionnelle, donc fractionner les protéines selon le poids moléculaire ou les peptides selon les propriétés physicochimiques et les analyser en chromatographie liquide suivie de la spectrométrie de

masse. Par contre si on veut regarder une dizaine de protéines, on va utiliser l'isolation par la méthode SRM pour le suivre spécifiquement et ensuite le quantifier. Ainsi, la largeur du crible est donc variable selon la complexité de l'échantillon.

II- Protéines biomarqueurs de pathologies

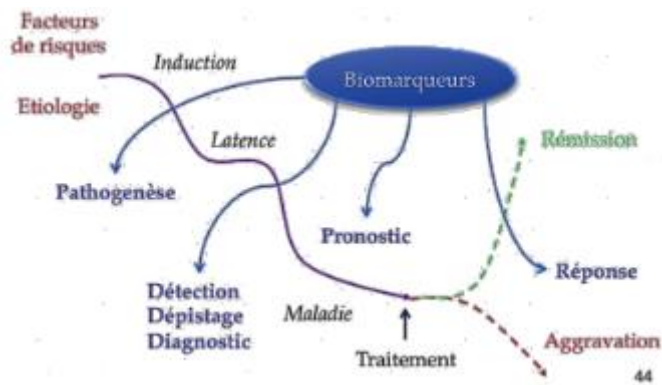
A- Définition d'un biomarqueur

- ✓ C'est une caractéristique **mesurable** liée à un processus biologique
- ✓ C'est un paramètre biophysique ou biochimique indicatif d'un **état physiopathologique** donné
- ✓ La **protéomique** permet la découverte et l'évaluation de nouveaux marqueurs de pathologies par **comparaison** des profils protéiques entre patients et contrôles.

Un biomarqueur est à la fois spécifique et sensible.

Exemples : l'albumine dans les urines permet de caractériser l'insuffisance rénale et la troponine I dans le sérum s'observe dans un infarctus du myocarde.

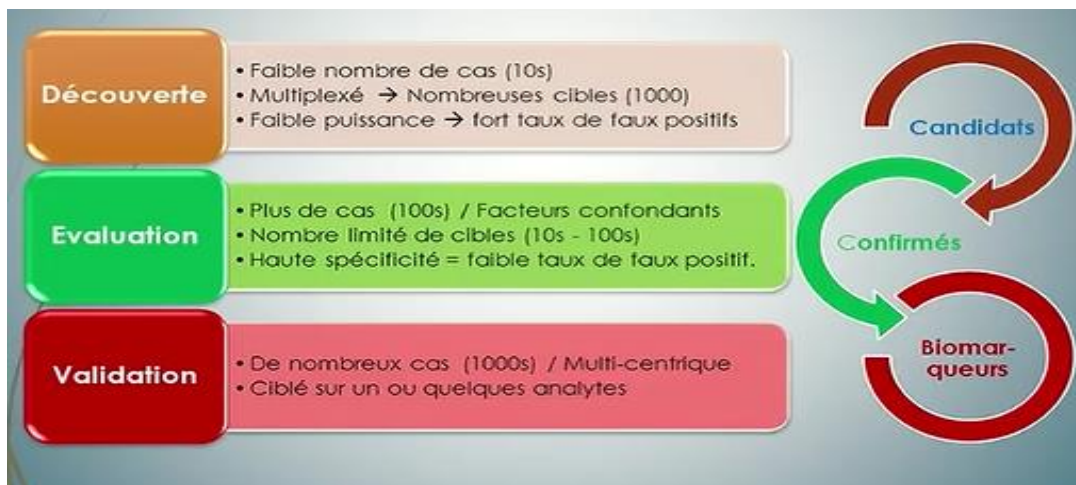
Biomarqueurs et évolution de la maladie



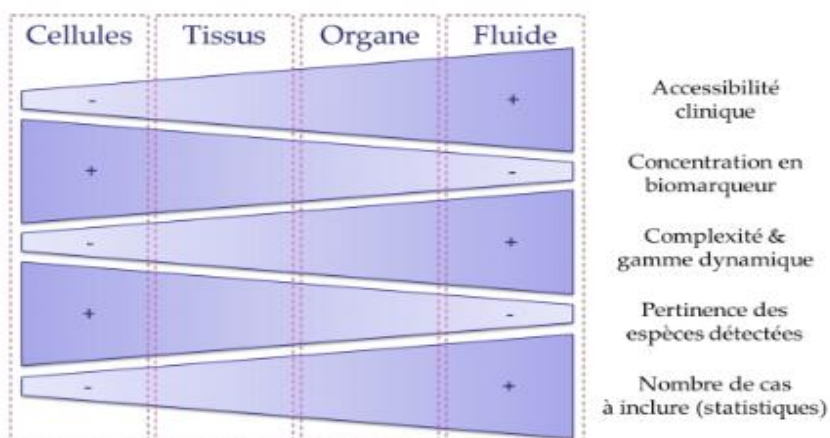
Il existe différents types de biomarqueurs : pathogénèse, détection, dépistage, diagnostic, pronostic, de réponse... La détection de ces biomarqueurs peut influencer sur le pronostic ou la réponse aux traitements, d'où l'intérêt d'un dépistage précoce.

B- Stratégies protéomiques

- Développement de biomarqueurs



- Echantillons pour la recherche de biomarqueurs



Partie 2 : Exemple d'application en recherche translationnelle

I- Stratégies protéomiques préalables

A- Optimisation de la collecte et de la préparation

1. Optimisation de la collecte

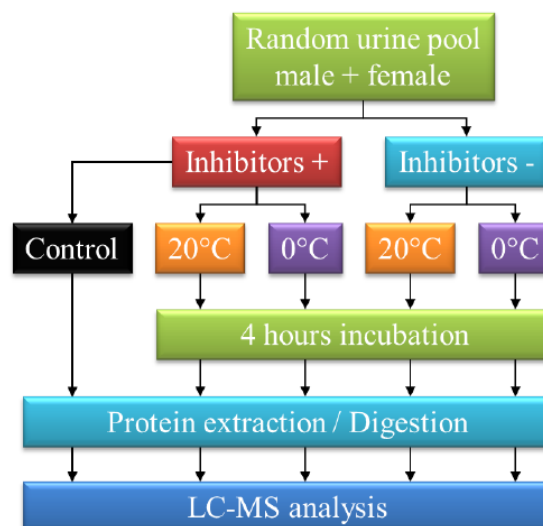
On s'intéresse maintenant à la découverte et à l'évaluation de biomarqueurs du cancer de la vessie dans l'urine dans le cadre du projet DecanBio. La protéomique est globale dans ce cas car elle concerne l'ensemble des protéines comprises dans l'urine.

Le cancer de la vessie est le 5^{ème} cancer le plus fréquent (le 2^{ème} pour le système urinaire), est un cancer à forte récurrence et à diagnostic compliqué (invasif et peu sensible).

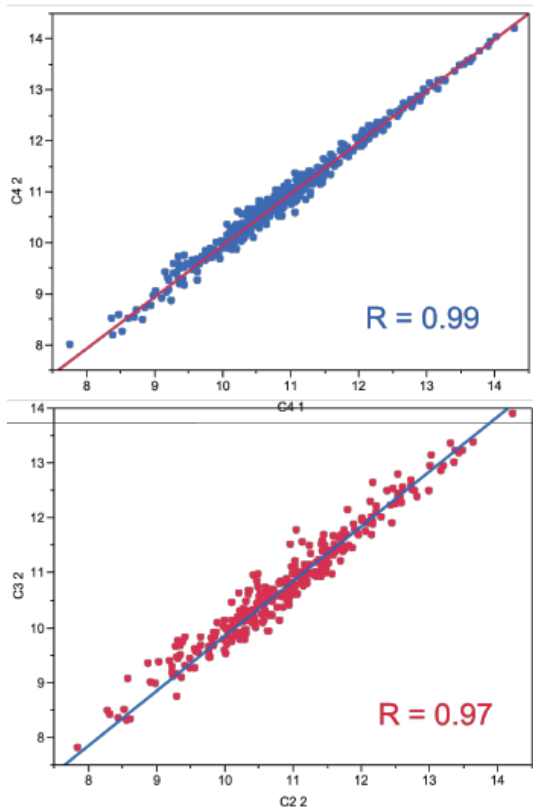
Différents critères ont été utilisés pour la constitution de la cohorte de découverte : suspicion de cancer chez les patients, évitement de diurétiques et d'activité sportive pour homogénéiser la cohorte, collecte d'urine avant cystoscopie afin de réduire les contaminations par le sang, un contrôle avec ou sans pathologies urinaires et la mise au point de procédure pré-analytiques compatibles avec l'analyse protéomique.

L'urine est un **fluide difficile** pour l'analyse protéomique car elle présente une variabilité inter-individuelle, elle contient beaucoup de produits de dégradation et de sels qui vont gêner l'identification des protéines et elle présente une large gamme dynamique. Afin d'optimiser la collecte on va déterminer s'il faut utiliser ou non des inhibiteurs de protéases, la température de stockage optimale avant centrifugation, l'usage d'antibactériens ou non et les conditions d'extraction et de digestion des protéines urinaires.

Une étude a été montée pour déterminer les conditions optimales de la collecte (inhibiteurs de protéases et température de stockage).



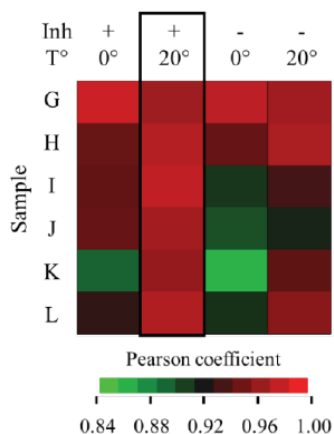
L'évaluation des résultats s'est faite par l'analyse des **corrélations** entre l'abondance des peptides détectés :



Tout d'abord, on a étudié la corrélation de l'abondance des peptides dans un même échantillon passé 2 fois en LC-MS. On retrouve une forte reproductibilité.

On analyse maintenant 2 échantillons distincts préparés en parallèle : on a encore une bonne reproductibilité de l'extraction et la digestion des protéines.

On obtient finalement le tableau suivant selon les conditions de réalisation de la collecte :



Ainsi, avec le coefficient de Pearson qui évalue la corrélation des résultats, on voit que les conditions optimales de la collecte sont une température de stockage de 20°C (ce qui permet d'éviter que certaines protéines comme l'uromoduline ne précipitent et soient perdues lors de la centrifugation) et la présence d'inhibiteurs de protéases.

Mot du RT : l'échantillon témoin a été analysé juste après le recueil des urines donc les conditions sont optimales au niveau de la dégradation des protéines.

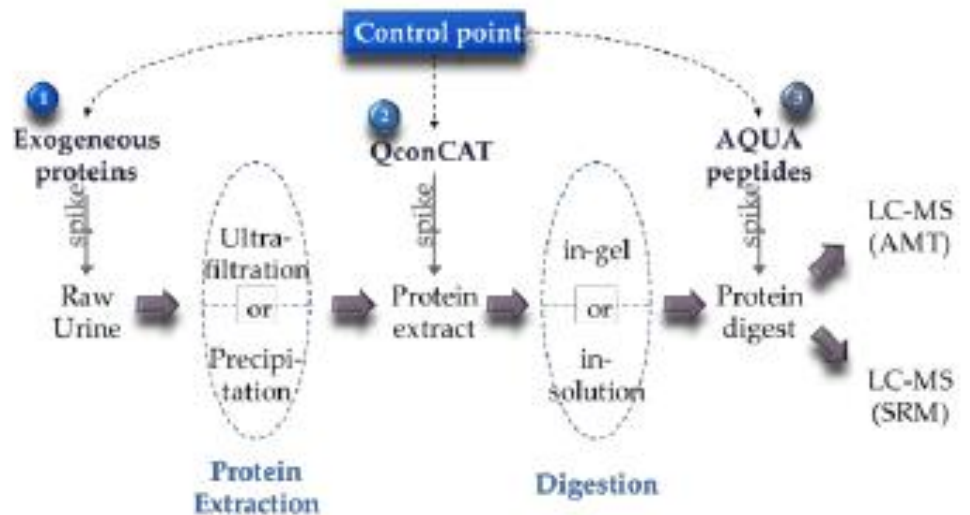
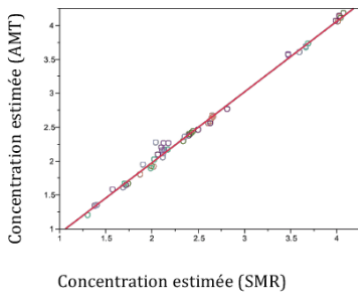
2. Standardisation de la préparation

On a comparé les méthodes d'extraction des protéines utilisées :

L'ultra-filtration

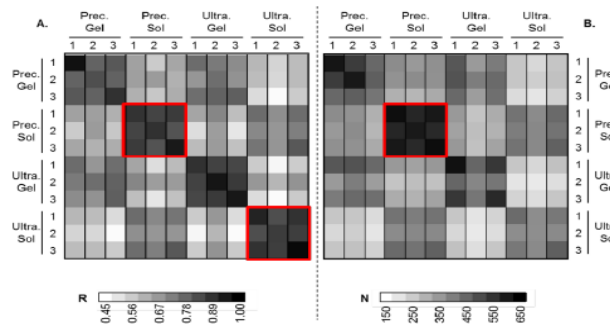
-La précipitation des protéines

On a utilisé pour les comparer différentes stratégies qui sont la SM non ciblée couplée à la chromatographie liquide, et une SM ciblée.



Des **standards de quantification marqués**, servant de points de contrôle à différents temps, sont introduits pour quantifier les peptides et le rendement : la protéine exogène ajoutée à l'urine, la Qconcat (protéine chimérique composée de peptides issus de différentes protéines), et l'AQUA peptide, ajoutée tardivement lors de l'analyse de l'échantillon.

On obtient donc l'estimation de la variabilité en fonction de la méthode utilisé :



L'**intensité** est donc maximale lors de la précipitation des protéines avec une digestion en solution ou une ultra-filtration des protéines avec encore une digestion en solution (on ne passe pas par le gel).

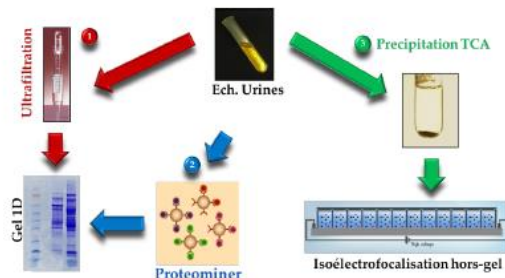
Le **rendement** d'extraction est lui optimal lors d'une précipitation acide suivie d'une digestion en solution. Le rendement reste cependant de seulement **40%** en raison des difficultés rencontrées lors de l'extraction et la digestion des protéines notamment.

La **gamme dynamique couverte** est également plus grande lors d'une précipitation et d'une digestion en solution.

Cette méthode a donc été retenue pour l'analyse de l'ensemble des urines de la cohorte.

De plus, pour connaître la corrélation entre les différentes méthodes de MS (ciblée avec SRM ou non dans le cas d'une AMT), on établit le graphe de corrélation suivant :

On voit donc que ces deux méthodes sont très correspondantes ce qui est rassurant car l'identification des biomarqueurs se fera par AMT et leur évaluation par SRM.



B- Bases de données et protéomes identifiables

Afin d'augmenter la puissance statistique lors de la phase découverte, il faut augmenter le nombre de cas, quantifier à haut débit pour un protéome élargi et sans marquage : cela nécessite une grande base de données. On a alors développé la **protéomique par tags AMT**.

Protéomique par AMT :

Elle repose sur le fait que si **la masse d'un peptide est unique dans un protéome donné**, elle peut servir d'identification au peptide et à sa protéine associée. On va donc déterminer, à l'aide de spectromètres de masse puissants, la masse du peptide.

De plus l'utilisation du **temps de rétention** complète la mesure de masse pour augmenter le **pouvoir discriminant** pour reconnaître le peptide identifié.

Cette méthode AMT repose sur 2 phases. Il y a d'abord **la phase préliminaire** où on va fractionner un extrait protéique, réaliser une HPLC puis une MS/MS pour obtenir la fréquence en acides aminés et donc identifier le peptide.

Durant cette première phase, on va analyser les urines par différentes méthodes de fractionnement pour avoir la base de données la plus complète possible :

-**L'ultra-filtration** qui permet d'éliminer les sels et les contaminants de plus de 3kda. On va ensuite étudier l'extrait protéique sur un gel SDS-page en 1D puis chaque bande est analysée au SM.

-**Le proteominer** qui utilise des billes sur lesquelles sont greffés des **hexapeptides** qui reconnaissent les protéines. Ainsi chaque peptide, qu'il soit minoritaire ou majoritaire, va se fixer sur la bille qui lui est propre en fonction de l'hexapeptide greffé sur cette bille. Ainsi, on réduit la gamme dynamique (égalisation) et donc le masquage des protéines minoritaires par les protéines majoritaires.

-**La précipitation par l'acide TCA** qui sépare les peptides suivant leur point iso-électrique.

La combinaison de toutes ces méthodes nous donne un maximum de couverture du protéome. Toutes ces analyses nous ont permis de créer une base de données du protéome urinaire d'environ 2000 protéines.

Ainsi, les mesures de masse et du temps de rétention permettent d'identifier le peptide chez un malade en confrontant ces grandeurs avec la base de données.

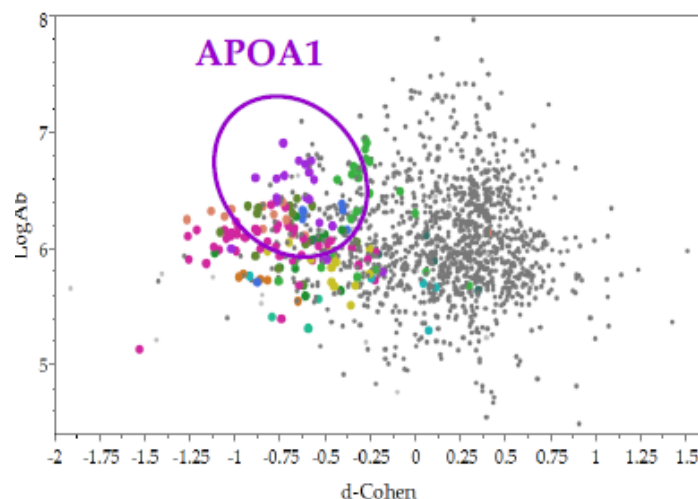
II- Découverte et évaluation des biomarqueurs urinaires

A- La phase de découverte

La base de données crée nous permet d'identifier précisément les peptides extraits chez les patients et de les **quantifier**. On va donc analyser les différences de **quantité** de peptides chez les patients selon qu'ils ont ou non un cancer de la vessie.

La cohorte de découverte compare donc des patients avec un cancer de la vessie avec des donneurs sains. L'abondance de l'ensemble des peptides extraits chez les patients est homogène ce qui permet de réaliser des analyses plus fines.

Afin de comparer les patients entre eux, on a utilisé le coefficient de Cohen qui compare l'abondance du contrôle/ le patient en fonction de la variabilité du peptide. On retrouve donc un biomarqueur surexprimé en cas de cancer de la vessie : l'**APOA1**.



Plus le risque de cancer est élevé, plus l'abondance d'APOA1 est augmentée.

B- La phase évaluation

La cohorte est plus étendue, la sélectivité est meilleure, la gamme dynamique large, rendant plus complexes et variables les échantillons. On se concentre davantage sur des méthodes ciblées, comme la **SRM**.

3 stratégies de standardisation permettent une quantification absolue :

- Les **AQUA** protéines ajoutées au dernier moment, mais à moindre rendement car les quantités initiales et finales peuvent différer
- La méthode de **QconCAT**
- Les protéines entières **PSAQ** ajoutées à l'urine dès le stade initial, ce qui est plus pertinent mais cher.

On retrouve ainsi un panel de 24 biomarqueurs du cancer de la vessie dont APOA1.

APOA1 est fortement détectée chez les contrôles mais permet néanmoins de **discriminer** les risques élevés de progression et de récurrence chez les patients incidents.

Mot du RT : La fin du cours a été consacrée à l'analyse de l'article et à des exemples sur les cellules micro-disséquées et la périlymphe et ne fait pas partie de cette ronéo car l'exemple du cours détaille toutes les méthodes et mécanismes mis en jeu. Vous pouvez cependant vous référer aux diapos si vous souhaitez détailler cette partie.

FICHE RECAPITULATIVE

PARTIE I : BASES DE LA PROTEOMIQUE

1) Introduction à la protéomique

Protéomique : Etude des protéines d'un système biologique donné dans des conditions physiologiques et environnementales spécifiques + identification quantification localisation des protéines dans cet environnement + comparaison de protéines dans des environnements différents

Complexité de la protéomique : 1 gène -> plusieurs protéines (redondance du code génétique)

Les développements technologiques :

- **Electrophorèse bidimensionnelle** : Séparer un mélange de protéines non hydrophobes, suivant leur poids isoélectrique (**pHi**) puis leur **poids moléculaire** sur un gel SDS page.

- **Séquençage d'Edman** : réaction entre amines primaires et phenyl isothiocyanate. Technique qui retire un par un les acides aminés **en N-ter** de la protéine. Cependant, cette technique est longue, et ne permet pas d'identifier les protéines de plus de 50 aa.

- **Spectrométrie de masse** : mesure le rapport masse sur charge **m/z** d'une particule chargée grâce à des champs électriques et magnétiques. L'ionisation des échantillons peut se faire en solution (par Electrospray) ou avec un laser assisté d'une matrice sous vide (Désorption/Ionisation Laser).

- **Spectrométrie de masse en tandem** : donne séquence du peptide par cassure de ce dernier en fragments

Protocole : Extraction des protéines, digestion enzymatique trypsique afin d'obtenir un peptide, chromatographie liquide, MS en tandem, Comparaison entre les données expérimentales et les bases de données afin d'identifier la protéine.

Quantification des protéines :

L'analyse des peptides d'une protéine n'est pas intrinsèquement quantitative. Elle est relativement quantitative (chaque signal est proportionnel à la concentration du peptide dans la protéine)

Approche comparative : on détermine **par dilution isotopique** la concentration du peptide endogène (non marqué) par comparaison du **rapport m/z** à un échantillon de peptide marqué de concentration connue.

Approche quantitative : par **SRM** = Selected Reaction Monitoring (MS ciblée) : Quantification d'un peptide précis par addition de standard isotopiquement alourdi puis par fragmentation et isolation du peptide et enfin suivi des signaux les plus intenses. Elle utilise la dilution isotopique qui augmente la spécificité et la sensibilité. Il existe aussi des méthodes protéomique globale.

2) Protéines biomarqueurs de pathologies

Biomarqueur : Paramètre biophysique ou biochimique indicatif d'un état physiopathologique donné. Ils ont un rôle important dans la pathogenèse, le dépistage, le diagnostic, le pronostic, ainsi que la réponse au traitement -> intérêt d'une identification précoce.

La protéomique permet la découverte et l'évaluation de nouveaux marqueurs de pathologies par comparaison des profils protéiques entre malades et contrôles.

Développement de biomarqueurs : 3 étapes : **DÉCOUVERTE** de candidats biomarqueurs (peu de cas, nombreuses cibles, faible puissance), **EVALUATION** pour candidats confirmés (+ de cas, cibles limités, facteurs confondants, haute spécificité), **VALIDATION** du biomarqueur (nombreux cas, dans différents centres, focalisation sur une cible)

Choix des échantillons pour les biomarqueurs : cellules, tissus, organes, fluides : leur accessibilité, complexité et le nombre de cas à inclure augmente de la cellule au fluide / leur concentration en biomarqueur, la pertinence des espèces détectées diminue.

PARTIE 2 : APPLICATION EN RECHERCHE TRANSLATIONNELLE

Découverte et évaluation de biomarqueurs du cancer de la vessie dans l'urine grâce au développement de stratégies de protéomique globale.

1) Stratégies protéomiques préalables

1. Constitution d'une **cohorte** de découverte de patients répondant à des critères précis, avec une suspicion de cancer de la vessie vs patients sains contrôles.

2. **Optimisation** de la collecte car l'urine est difficile à analyser (variabilité individuelle car pas d'homéostasie, déchets ...). Pour déterminer la meilleure condition parmi celles testées, on cherche le meilleur coefficient de corrélation entre les échantillons malades dans les différentes conditions avec les contrôles (grâce au coefficient de Pearson) -> condition de collecte retenue : à 20° avec inhibiteur de protéases

3. **Préparation** des échantillons : choix des **méthodes protéomiques** de digestion (Gel vs Solution) et d'extraction (Ultrafiltration vs Précipitation) des protéines. Méthodes retenues : digestion en solution et extraction à précipitation.

Bases de données par AMT : utilise la **masse** et le temps de rétention uniques d'un peptide dans la protéine pour identifier cette protéine -> on crée des bases de données en identifiant les peptides suite à la détermination de la masse du peptide par MS/MS après fractionnement qui se fait par ultrafiltration, protéomiser et précipitation par l'acide TCA.

2) Découverte et évaluation des biomarqueurs urinaires

1.**DÉCOUVERTE** : méthode MS/MS (l'AMT = méthode globale) -> carte protéomique urinaire (+ de 2000 protéines). La masse et temps de rétention des peptides permet de déduire leur **abondance relative** (vs contrôle sain) pour chaque patient. L'abondance est proportionnelle au risque.

On a recensé la protéine APOA 1 avec une concentration plus élevée chez les patients incidents (tumeur de la vessie déjà présente, et ce pour la 1ère fois) que chez les contrôles.

2.**ÉVALUATION** : méthode ciblée (SRM) : méthodes de **quantification absolue** testées (peptides standards, concatémères de protéines ou protéines entières) + quantification relative des peptides par rapport aux échantillons de patients ayant d'autres maladies urinaires.

3) Conclusion

Finalement, un panel de 24 protéines, dont l'APOA1 a été trouvé pour distinguer les contrôles urologiques des patients présentant un cancer de la vessie.