



# Recherche de biomarqueurs de la neurotoxicité des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine: approche protéomique quantitative

Emilie Ernoult

► **To cite this version:**

Emilie Ernoult. Recherche de biomarqueurs de la neurotoxicité des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine: approche protéomique quantitative. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2011. Français. <tel-00668340>

**HAL Id: tel-00668340**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00668340>**

Submitted on 9 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Recherche de biomarqueurs de la neurotoxicité des  
traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine:  
approche protéomique quantitative**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité: Biologie cellulaire

Ecole doctorale Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

le 22 avril 2011

à Angers par

**Emilie ERNOULT**

Devant le jury ci-dessous:

Christian LARROQUE (rapporteur), Directeur de Recherche Inserm, Montpellier

Michel SEVE (rapporteur), Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Grenoble

François LASBENNES (examineur), Professeur Emérite, Strasbourg

Erick GAMELIN (invité), Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Angers

Catherine GUETTE (directrice de thèse), Chercheur-Biologiste CRLCC, Angers

Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers Inserm UMR 892

Equipe 12 "Thérapies ciblées dans le traitement du cancer colorectal"

Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin, Angers



*A Messieurs le Docteur Christian Larroque et le Professeur Michel Sève qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je les remercie vivement pour leurs conseils avisés et l'attention portée à la correction de ce manuscrit.*

*A Monsieur le Professeur François Lasbennes que je remercie vivement de prendre part à ce jury. Que l'intérêt constant porté à ce travail et sa précieuse collaboration soient salués.*

*A Monsieur le Professeur Erick Gamelin que je remercie tout particulièrement de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance non seulement pour sa présence en ce jour de soutenance, ainsi que pour ses encouragements pérennes.*

*A Madame le Docteur Catherine Guette. Combien je lui suis reconnaissante de m'avoir confié cette étude et tracé le chemin de la Protéomique.*

*Confiance, enthousiasme, dévouement, exigences scientifiques, ont été les moteurs d'un travail soutenu, prospère et nourri d'une constante complicité. L'attention et l'encadrement tout particuliers dont elle a fait preuve à mon égard m'ont amenée à côtoyer l'enseignement et à enrichir ma formation lors de congrès et rencontres scientifiques.*

*Puisse ce travail de longue haleine s'avérer à la hauteur de ses légitimes attentes.*

*A Monsieur le Professeur Olivier Coqueret. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*A Monsieur le Docteur Benjamin Barré pour l'intérêt porté à ce travail.*

*A Madame le Docteur Michèle Boisdrion-Celle et Monsieur le Professeur Alain Morel pour m'avoir suivie dans l'avancement de ce projet.*

*Aux membres du Rotary Club d'Angers pour leur soutien financier. Qu'ils soient assurés de notre considération respectueuse.*

*A toute l'équipe du Laboratoire d'Oncopharmacologie: Marie-Claire, Catherine, Sabrina, Luc, Julie, Adélaïde, Vincent pour leur gentillesse, leur présence bienveillante, leur disponibilité et leur aide précieuse.*

*A Sandy, Hélène, Julia, Alice, Andreea, Sophie, Agnès, Anthony, Arnaud, Sory, Amélie, Clotilde, Aude-Hélène, Damien, Audrey, Jérôme, Barbara, Elisa, Anne-Charlotte et Laurence dont la cohésion de groupe et la bonne humeur quotidienne au laboratoire m'ont permis d'œuvrer sereinement.*

*A Madame Brigitte Lemarquand, documentaliste à l'ICO Paul Papin.*

*A Madame Jessy Delaye et Monsieur Jérémy Davy, Assistants de Recherche Clinique à l'ICO Paul Papin.*

*A Madame Anne-Lise Poirier, statisticienne à l'ICO Paul Papin.*

*Au personnel de l'Unité de Reconstitution des Chimiothérapies de l'ICO Paul Papin.*

*A Monsieur le Docteur Gérard Larcher pour m'avoir accompagnée dans mon initiation à la technique d'électrophorèse bidimensionnelle.*

*A Muriel Bahut, de la Plateforme Technologique d'Angers, que je remercie sincèrement et chaleureusement pour notre étroite collaboration dans l'apprentissage de la technologie DIGE.*

*A Messieurs Dominique Dutaud, André Bluze, Josef Büllles, Bruno Bacher et Madame Catherine Schlindwein de chez GE Healthcare ainsi qu'à Philippe Bogard de chez Nonlinear Dynamics pour leur soutien technique et toutes leurs précieuses astuces pratiques en DIGE.*

*A Amandine Léger, Nathalie Ramirez et Sandrine Lalain de l'Ecole de l'ADN des Pays de la Loire, pour m'avoir donné l'occasion de participer en tant qu'animatrice scientifique auprès du public aux journées consacrées à la Fête de la Science.*

*A Marie-Laure, Hélène et Sandy ainsi qu'à Laurent et Alice que je remercie de tout cœur pour leur amitié toujours fidèle et leur soutien lors de certains passages à vide.*

*A Maman parce que c'est elle.*

*A Papa qui, de l'au-delà, m'a soutenue.*

*A mes sœurs Elodie et Elise. J'aimerais qu'elles puissent se voir à travers mon regard, elles sauraient alors quelles merveilleuses jeunes femmes elles sont devenues.*

*A Anthony, Maxime, Thomas, Ariane, René, Jean-Sébastien, Pauline, Valérie, Julien, Frédo, Matthieu et Geoffrey pour leur présence tout simplement.*

*Enfin, à tous ceux et celles qui auraient échappé malencontreusement à mon attention dans ces lignes !*

# **Recherche de biomarqueurs de la neurotoxicité des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine: approche protéomique quantitative**

Avant-propos: vers l'individualisation des traitements en oncologie p.8

INTRODUCTION p.10

La neurotoxicité de l'oxaliplatine p.11

Les anticancéreux à base de platine p.11

La pharmacocinétique de l'oxaliplatine (quelques données) p.11

La cytotoxicité de l'oxaliplatine p.12

Le développement de l'oxaliplatine:

indications thérapeutiques et profil de tolérance p.14

Les composantes de la neurotoxicité de l'oxaliplatine et leur incidence p.16

La pathogénie de la neurotoxicité de l'oxaliplatine p.17

Les options de neuroprotection p.19

Vers la recherche de biomarqueurs p.20

La percée de la protéomique en clinique p.23

*De l'importance du protéome à l'avènement de la protéomique p.24*

Le protéome originel p.24

La dynamique du protéome p.24

La spéciation protéique p.26

La genèse de la protéomique p.26

Le concept de la protéomique p.27  
Les enjeux de la protéomique p.28  
Les différentes approches protéomiques p.29  
Le rôle-clé de la spectrométrie de masse p.30  
Le déroulement multi-étapes d'une analyse protéomique p.31

*L'amélioration de la couverture protéomique par fractionnement multidimensionnel p.33*

Les défis liés à l'analyse protéomique d'échantillons biologiques p.33  
La réduction de la complexité des échantillons protéiques/peptidiques par fractionnement multidimensionnel p.34  
L'électrophorèse bidimensionnelle p.35  
La méthode MudPIT p.36  
La séparation par GeLC-MS p.36  
La technologie IEF-OFFGEL p.36

*La protéomique quantitative p.37*

La quantification par électrophorèse bidimensionnelle: la DIGE-2D p.37  
Les principes généraux de la quantification par spectrométrie de masse p.37  
Le marquage au  $^{15}\text{N}$  p.39  
Le marquage SILAC p.39  
Le marquage enzymatique ( $^{18}\text{O}$ ) p.40  
Le marquage ICPL p.40  
Le marquage ICAT p.41  
Le marquage iTRAQ p.41  
Le marquage TMT p.42  
Le comptage de spectres p.43  
L'indice d'abondance protéique p.43

*L'application de la protéomique au développement de biomarqueurs  
d'intérêt clinique p.44*

La promesse des biomarqueurs protéiques en clinique p.44

Les défis liés à la découverte de biomarqueurs dans le plasma sanguin p.45

La découverte de biomarqueurs à partir de modèles cellulaires  
et de milieux de culture conditionnés p.48

De la découverte à la validation d'un biomarqueur p.50

Contexte et objet de l'étude p.54

**MATERIELS ET METHODES p.57**

**RESULTATS p.70**

Mise en place d'un protocole expérimental pour l'amélioration de la couverture protéomique, associant marquage iTRAQ et fractionnement par IEF-OFFGEL p.71

Application du protocole expérimental associant marquage iTRAQ et fractionnement OFFGEL à la recherche de biomarqueurs protéiques dans le plasma sanguin p.75

Analyse du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y traitées par l'oxaliplatine par une double approche protéomique quantitative p.78

Analyse protéomique quantitative du sécrétome des cellules SH-SY5Y différenciées traitées par l'oxaliplatine p.84

## DISCUSSION p.91

La complémentarité des approches protéomiques quantitatives p.92

La caractérisation protéomique de la neurotoxicité de l'oxaliplatine p.94

Le sécrétome d'une lignée de neuroblastome humain différenciée, un modèle pour la découverte de biomarqueurs de la neurotoxicité de l'oxaliplatine p.99

La Neudésine, candidat biomarqueur de la neurotoxicité de l'oxaliplatine p.102

Conclusion et perspectives p.107

Annexes p.108

Bibliographie p.125

## Abréviations et acronymes

**2D:** en 2 dimensions

**5FU:** 5-fluorouracile

**AF:** acide folinique

**AK:** adénylate kinase

**AMM:** autorisation de mise sur le marché

**BDNF:** Brain-Derived Neurotrophic Factor

**CHIP:** chimiohyperthermie intrapéritonéale

**CL:** chromatographie liquide

**CTRL:** contrôle

**DACH:** 1,2-diaminocyclohexane

**DIGE:** Difference In Gel Electrophoresis

**E-1D:** électrophorèse en 1 dimension

**E-2D:** électrophorèse bidimensionnelle

**ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**FDA:** Food and Drug Administration

**GAD:** Genetic Association Database

**GO:** Gene Ontology

**HPP:** Human Proteome Project

**HUPO:** Human Proteome Organisation

**ICAT:** Isotope Coded Affinity Tag

**ICPL:** Isotope-Coded Protein Label

**IEF:** isoélectrofocalisation

**iTRAQ:** Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification

**MALDI:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

**MMTS:** methyl methanethiosulfonate

**MPT:** modification post-traductionnelle

**MRM:** Multiple Reaction Monitoring

**NCI:** National Cancer Institute

**NCI-CTCAE:** National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria for Adverse Event

**NIH:** National Institutes of Health

**OMIM:** Online Mendelian Inheritance in Man

**OX1:** 1  $\mu$ M d'oxaliplatine

**OX10:** 10  $\mu$ M d'oxaliplatine

**OX5:** 5  $\mu$ M d'oxaliplatine

**OX50:** 50  $\mu$ M d'oxaliplatine

**PAI:** Protein Abundance Index (indice d'abondance protéique)

**pI:** point isoélectrique

**PPP:** Plasma Proteome Project

**RE:** reticulum endoplasmique

**ROS:** Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)

**RP:** Reverse Phase (phase inverse)

**RPLC:** Reverse Phase Liquid Chromatography (chromatographie liquide en phase inverse)

**SCX:** Strong Cation-eXchange (chromatographie par échange de cations)

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

**SELDI:** Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

**SID:** Stable Isotope Dilution

**SILAC:** Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture

**SISCAPA:** Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies

**SM:** spectrométrie de masse

**SM/SM:** spectrométrie de masse en tandem

**SRM:** Selected Reaction Monitoring

**TMT:** Tandem Mass Tag

**TOF:** Time-Of-Flight



## Avant-propos

### Vers l'individualisation des traitements en oncologie

Les agents anticancéreux cytotoxiques sont caractérisés par un faible index thérapeutique: la gamme de concentrations sanguines dans laquelle chaque médicament présente à la fois une activité et une toxicité acceptable est particulièrement étroite (Marquet and Rousseau, 2008). Ainsi, une méthode d'ajustement de posologie a été proposée. En pratique courante, la majorité des médicaments anticancéreux est prescrite à dose standard, en fonction de la surface corporelle ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ), selon l'hypothèse que les patients ayant une plus grande surface corporelle ont un volume de distribution ainsi qu'une capacité d'élimination plus importants (Pétain and Chatelut, 2008). Dans cette stratégie dite d'intensité de dose, une dose identique est administrée à chaque cure. En cas de toxicité limitante, la dose administrée à la cure suivante est diminuée empiriquement ou la cure est reportée (Marquet and Rousseau, 2008). La formule de calcul de la surface corporelle la plus communément utilisée est celle de Du Bois et Du Bois (1989):

Surface corporelle (en  $\text{m}^2$ ) = Poids (en Kg)<sup>0,425</sup> x Taille (en cm)<sup>0,725</sup> x 0,007184.

Toutefois, la même dose d'un médicament anticancéreux chez des patients de surface corporelle proche ne produit pas toujours les mêmes effets. Il apparaît qu'il existe une relation plus étroite entre la concentration plasmatique et les effets antitumoraux ou toxiques qu'entre la dose et les effets pharmacodynamiques. Une grande variabilité pharmacocinétique interindividuelle, concernant l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'élimination, conditionne la relation entre la dose initiale et la concentration plasmatique (Pétain and Chatelut, 2008). Ceci justifie donc l'adaptation individuelle des traitements anticancéreux: la bonne dose du bon médicament à chaque patient, en fonction de critères individuels et des caractéristiques de chaque tumeur.

L'individualisation des prescriptions en oncologie permettrait d'optimiser l'utilisation des traitements anticancéreux, en limitant de façon appréciable les phénomènes de toxicité et de résistance tout en économisant des semaines d'hospitalisation et des prescriptions inutiles.

L'individualisation thérapeutique est au centre d'une pratique médicale en constante progression. Le séquençage du génome humain a apporté de nouveaux outils, en particulier

grâce à l'identification de polymorphismes constitutionnels de gènes impliqués dans le métabolisme ou l'activité des médicaments anticancéreux (la pharmacogénétique, Robert and Le Morvan, 2008). Le séquençage du génome humain a aussi ouvert la voie de la recherche de biomarqueurs, suite au développement de nouvelles technologies d'analyse à grande échelle des gènes (la génomique), de l'expression des gènes (la transcriptomique), des protéines (la protéomique), des petites molécules (la métabolomique).

Selon la définition proposée aux USA en 1998 par l'Institut National de la Santé (National Institutes of Health, NIH) et unanimement jugée satisfaisante,

***un biomarqueur désigne une caractéristique mesurée objectivement (c'est-à-dire avec une précision et une reproductibilité suffisantes) et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou de l'action des médicaments.***

Il ne s'agit pas d'un concept nouveau. L'utilisation de paramètres anatomiques, physiologiques ou moléculaires est courante en pratique médicale. Ainsi, la fièvre est un indicateur d'infection, le cholestérol est un indicateur de risque cardiovasculaire. Toutefois, le terme de biomarqueur est assez nouvellement employé depuis l'émergence des disciplines en -omique.

La découverte de biomarqueurs apparaît comme la pierre angulaire de la médecine moderne dite personnalisée. Les biomarqueurs ont différentes finalités en médecine. Se distinguent les biomarqueurs diagnostiques (présence d'une maladie), pronostiques (évolution de la maladie), prédictifs (efficacité, toxicité d'un traitement). En Recherche et Développement pharmaceutique, l'utilisation des biomarqueurs à tous les stades de développement des médicaments tend à se généraliser (Marrer and Dieterle, 2010).

La thématique de notre laboratoire s'inscrit dans cette démarche d'individualisation des traitements anticancéreux, particulièrement ceux du cancer colorectal. L'oxaliplatine est un agent anticancéreux essentiel dans la lutte contre le cancer colorectal métastatique. Depuis plusieurs années, notre équipe s'efforce de caractériser et prévenir la neurotoxicité de ce médicament. Fin 2006, le CRLCC Paul Papin s'est équipé d'une plateforme protéomique. Aussi, nous nous sommes proposés à la recherche de biomarqueurs de la neurotoxicité des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine, par approche protéomique quantitative.

# **INTRODUCTION**

## La neurotoxicité de l'oxaliplatine

Lorsque les patients ayant un cancer colorectal présentent des métastases, la chimiothérapie permet de prolonger leur vie et d'en améliorer la qualité. Le 5-fluorouracile (5FU), de la famille des fluoropyrimidines, a longtemps été le seul traitement disponible jusqu'au développement dans les années 90 de deux nouveaux médicaments cytotoxiques, l'irinotécan et l'oxaliplatine (Tournigand and de Gramont, 2006). L'oxaliplatine appartient à la troisième génération d'une famille d'anticancéreux dérivés du platine, après le cisplatine et le carboplatine (Figure I-1).

**Les anticancéreux à base de platine.** Le cisplatine (*cis*-dichlorodiammineplatinum(II)) a été décrit en 1844 sous le nom de "Peyrone's chloride" mais c'est Rosenberg dans les années 60 qui le premier a eu l'intuition de son potentiel en cancérologie. Après avoir observé l'inhibition de la croissance bactérienne sous l'effet d'un champ électrique, il a découvert que les produits d'électrolyse provenant des électrodes de platine possédaient des propriétés cytotoxiques (Rosenberg *et al.*, 1965 ; Rosenberg *et al.*, 1969). Dans les années 70, l'efficacité remarquable du cisplatine dans le traitement du cancer, en particulier du cancer de l'ovaire et du cancer du testicule a été établie (Kelland, 2007). Toutefois, le cisplatine présentait de nombreux effets secondaires, principalement une toxicité rénale, une toxicité gastro-intestinale (diarrhées, vomissements, nausées), une ototoxicité et une toxicité neurologique, ce qui a stimulé le développement d'autres dérivés du platine avec une activité antitumorale supérieure, une meilleure tolérance ou une absence de résistance croisée (Desoize and Madoulet, 2002). Environ 3000 molécules ont été synthétisées et testées *in vitro* mais des essais cliniques ont été initiés que pour une trentaine d'entre elles. Actuellement, 4 dérivés sont utilisés en clinique, le cisplatine, le carboplatine, l'oxaliplatine et le nédaplatine, d'autres semblent très prometteurs comme le satraplatine ou le picoplatine (Teicher, 2008).

**La pharmacocinétique de l'oxaliplatine (quelques données).** L'oxaliplatine (1,2-diamino cyclohexane(*trans-l*)oxalatoplatinum(II)), de formule brute  $C_8H_{14}N_2O_4Pt$  et de masse molaire

397,3 g/mol, est constitué d'un atome de platine (Pt) central complexé avec un groupement 1,2-diaminocyclohexane (DACH) et un ligand oxalate hydrolysable (Figure I-2). Cette structure confère une meilleure activité antitumorale, la perte relative d'une résistance croisée avec le cisplatine et la solubilité du composé en phase aqueuse (Graham *et al.*, 2004 ; Gamelin *et al.*, 2006).

La concentration maximale du médicament dans le plasma se situe entre 6,5 et 9  $\mu\text{M}$  après 2 h de perfusion d'oxaliplatine à 130  $\text{mg}/\text{m}^2$ . En moyenne, la concentration plasmatique d'oxaliplatine est de 5  $\mu\text{M}$  après 2 h de perfusion à 85  $\text{mg}/\text{m}^2$  (Graham *et al.*, 2000). La part du médicament se liant irréversiblement aux protéines plasmatiques (principalement à l'Albumine), perdant ainsi tout potentiel antitumoral, s'élève à 35 % (Desoize and Madoulet, 2002). Aussi, la moitié du platine s'accumule au sein des érythrocytes, la demi-vie de 29-50 jours correspondant à la demi-vie des érythrocytes eux-mêmes indique qu'une fois entré dans les cellules, l'oxaliplatine est piégé et ne diffuse pas (Lévi *et al.*, 2000). La fraction libre du médicament restante est largement distribuée dans les tissus selon un volume de distribution apparent de 440 L et l'élimination de l'organisme est principalement réalisée par clairance rénale (Kweekel *et al.*, 2005). Les études pharmacocinétiques n'ont pas révélé d'interactions entre l'oxaliplatine et le 5FU ou l'irinotecan (Kim and Erlichman, 2007).

L'oxaliplatine est activé par hydrolyse non enzymatique via la substitution du groupement oxalate (Figure I-3). Au moins 17 dérivés contenant du platine ont été observés dans le plasma ultrafiltré des patients traités (Kim and Erlichman, 2007). Aucun métabolisme médié par le cytochrome P450 n'a été décrit. La biotransformation de l'oxaliplatine aboutit aux composés mono-chloro-, dichloro- puis diaquo-DACH-platine, ce dernier étant le métabolite actif hautement réactif de l'oxaliplatine, capable de former des adduits avec l'ADN et les protéines (Kweekel *et al.*, 2005).

**La cytotoxicité de l'oxaliplatine.** Il est communément accepté que les dommages à l'ADN, affectant les cellules à fort pouvoir prolifératif que sont les cellules cancéreuses, soient responsables des propriétés cytotoxiques antitumorales des sels de platine.

L'activité cytotoxique de l'oxaliplatine, comme celle du cisplatine, suit 4 étapes: (i) l'accumulation du médicament à l'intérieur des cellules tumorales à la fois par diffusion passive et par transport actif à travers le transporteur de cuivre CTR1 (Ishida *et al.*, 2002 ;

Holzer *et al.*, 2004) ; (ii) l'activation des complexes de platine par le remplacement successif du ligand oxalate par 2 ligands chlorure puis 2 molécules d'eau à l'entrée dans les cellules suite à la chute brutale de la concentration en ions chlorure par rapport au milieu extracellulaire (Kweekel *et al.*, 2005) ; (iii) la liaison des dérivés hydratés de l'oxaliplatine à l'ADN cible avec formation d'adduits Pt-ADN (Todd and Lippard, 2009) et (iv) la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (Wang and Lippard, 2005 ; Jung and Lippard, 2007).

Les résidus diaquo-DACH-platine se lient à l'ADN en position N7 des bases azotées puriques pour former majoritairement des adduits intra-brins 1,2-Pt(DACH)-d(GpG) entre 2 guanosines adjacentes, minoritairement des adduits intra-brins 1,2-Pt(DACH)-d(ApG) entre une adénosine et une guanosine et rarement des adduits inter-brins (Todd and Lippard, 2009). Les adduits Pt-ADN distordent alors la structure de la double hélice d'ADN (Scheeff *et al.*, 1999) et perturbent plusieurs processus cellulaires. L'arrêt de la réplication de l'ADN a longtemps été considéré comme le mécanisme clé de la cytotoxicité des sels de platine. D'autres données suggèrent que les adduits inhibent l'initiation et l'élongation de la transcription en détournant les facteurs de transcription, bloquant le passage de l'ARN polymérase, gênant le remodelage de la chromatine. L'inhibition de la synthèse des ARNm nécessaires à la mitose conduit au blocage du cycle cellulaire en phase G2 et ultimement à l'activation de l'apoptose p53-dépendante ou indépendante lorsque les lésions à l'ADN ne sont pas réparées (Todd and Lippard, 2009 ; Derheimer *et al.*, 2005 ; Gartel, 2008).

Plusieurs mécanismes de résistance diminuent l'impact du cisplatine et de l'oxaliplatine et conduisent à l'échec de la chimiothérapie: (i) la moindre accumulation intracellulaire du médicament liée à la sous-expression du transporteur CTR1 (Howell *et al.*, 2010) ; (ii) la baisse du nombre d'adduits Pt-ADN formés suite à l'inactivation des dérivés diaquo par thiolation médiée par la Glutathione S-transférase-pi (GST-pi), enzyme de détoxification (Rolland *et al.*, 2010) ; (iii) l'efficacité de la réparation de l'ADN (Kim and Erlichman, 2007 ; Seetharam *et al.*, 2010), en particulier par le système NER (Nucleotide Excision Repair) et (iv) le dysfonctionnement des voies de signalisation apoptotiques (Siddik, 2003). L'activité cytotoxique de l'oxaliplatine est supérieure à celle du cisplatine malgré une plus faible fréquence de formation des adduits Pt-ADN (Raymond *et al.*, 2002 ; Rixe *et al.*, 1996). Le groupement DACH, caractéristique de l'oxaliplatine, fait saillie à l'extérieur du grand sillon de l'ADN. Son encombrement et le rétrécissement du sillon gênent la liaison des protéines du système de réparation MMR (MisMatch Repair) aux adduits Pt-ADN. Ceci peut expliquer les

différences de sensibilité des cellules tumorales au cisplatine et à l'oxaliplatine (Kim and Erlichman, 2007).

**Le développement de l'oxaliplatine: indications thérapeutiques et profil de tolérance.** La molécule d'oxaliplatine a été découverte en 1976 à l'Université de Nagoya au Japon mais c'est en France quelques années plus tard que son potentiel anticancéreux a été remarqué par Georges Mathé à l'hôpital Paul-Brousse de Villejuif (Mathé *et al.*, 1986). L'oxaliplatine présentait un large spectre antitumoral, différent de celui du cisplatine avec lequel il n'avait pas de résistance croisée. Son développement a été assuré par Debiopharm puis Sanofi (André and De Gramont, 2006). Les premiers essais cliniques ont montré des réponses tumorales chez des patients présentant un cancer colorectal métastatique, cancer peu sensible au cisplatine, en association avec le 5FU et l'acide folinique (AF). L'oxaliplatine en monothérapie s'avérait peu efficace (Levi *et al.*, 1993). Différents schémas Folfox (5FU, AF et oxaliplatine) ont alors été développés afin d'optimiser la dose et le mode d'administration du 5FU et de l'oxaliplatine (Tournigand and de Gramont, 2006). L'oxaliplatine (Eloxatine<sup>®</sup>) a obtenu sa première autorisation de mise sur le marché (AMM) en France en 1996 en seconde ligne du cancer colorectal métastatique, c'est-à-dire en cas d'échec de la chimiothérapie à base de 5FU et d'AF (schéma LV5FU2) considérée alors comme le traitement standard en première intention. Une étude clinique de phase III en première ligne du cancer colorectal métastatique a ensuite été lancée (étude C95) où le schéma LV5FU2 était comparé au schéma Folfox4 (LV5FU2 + oxaliplatine 85 mg/m<sup>2</sup> tous les 15 jours) chez 420 patients (de Gramont *et al.*, 2000). L'adjonction d'oxaliplatine a démontré un bénéfice significatif par rapport au traitement standard avec une augmentation du taux de réponse (50,7 versus 22,3 %,  $p = 0,0001$ ) et de la survie sans progression (9,0 versus 6,2 mois,  $p = 0,0001$ ). Les toxicités de grades 3 ou 4 observées plus fréquemment avec le Folfox4 étaient les neutropénies (41,7 versus 5,3 %), les diarrhées (11,9 versus 5,3 %), les vomissements (5,8 versus 2 %), les nausées (5,7 versus 2 %) et les neuropathies périphériques liées à l'oxaliplatine (18,2 versus 0 %). L'oxaliplatine a obtenu son enregistrement en première ligne du cancer colorectal métastatique, tout d'abord en France, puis en Europe en 1999. L'année suivante, Sanofi devenu Sanofi-Synthélabo a relancé un nouveau plan de développement clinique en seconde ligne en vue de soumettre un dossier d'AMM de l'oxaliplatine devant la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis (Rothenberg *et al.*, 2003). L'enregistrement a été obtenu en 2002. Le schéma IFL (irinotecan, AF et 5FU en bolus) était alors considéré comme le

traitement standard en première intention aux Etats-Unis. Une vaste étude randomisée de phase III en première ligne du cancer colorectal métastatique (étude N9741) a comparé le schéma IFL au schéma Folfox4 et à une association d'irinotecan et d'oxaliplatine (Irox) chez 795 patients (Goldberg *et al.*, 2004). Les résultats ont montré une efficacité supérieure du schéma Folfox4 avec un taux de réponse de 45 % versus 31 % pour l'IFL ( $p = 0,002$ ) et 35 % pour l'Irox ( $p = 0,03$ ), une survie sans progression de 8,7 mois versus 6,9 mois pour l'IFL ( $p = 0,0014$ ) et 6,5 mois pour l'Irox ( $p = 0,001$ ), une survie globale de 19,5 mois versus 15 mois pour l'IFL ( $p = 0,0001$ ). Les toxicités de grades 3 ou 4 suivantes étaient moins fréquentes avec le Folfox4 qu'avec l'IFL: neutropénies fébriles (4 versus 15 %), nausées (6 versus 16 %), vomissements (3 versus 14 %), diarrhées (12 versus 28 %). En revanche, l'oxaliplatine était à l'origine de neuropathies périphériques avec 18 % de paresthésies de grade 3. L'oxaliplatine a obtenu l'AMM en première ligne du cancer colorectal métastatique aux Etats-Unis en 2004.

Compte tenu de son indéniable efficacité, l'oxaliplatine est devenu en quelques années un standard de traitement pour les patients ayant un cancer colorectal présentant des métastases. Dernièrement, 3 agents biologiques ont été introduits, le bevacizumab qui cible l'angiogenèse, le cetuximab et le panitumumab qui ciblent la croissance tumorale. De nombreuses études cliniques ont évalué leur addition aux associations 5FU (ou capécitabine, fluoropyrimidine d'administration orale) et oxaliplatine ou irinotecan. Aussi aujourd'hui, le taux de réponse atteint 50-60 %, la survie sans progression 9-11 mois et la survie globale 20-24 mois (Giuliani *et al.*, 2010).

L'oxaliplatine a connu un autre développement, dans le traitement adjuvant, après chirurgie, du cancer du côlon (études Mosaic en Europe et NSABP C07 aux Etats-Unis). La chirurgie représente le premier traitement des cancers du côlon localisés (stades I à III) mais sans chimiothérapie complémentaire après exérèse de la tumeur primitive, une part importante des patients opérés connaît une récurrence sous la forme de métastases (André *et al.*, 2006). En 2003, les premiers résultats de l'étude de phase III Mosaic dans laquelle ont été inclus 2246 patients, présentés lors du congrès annuel de l'Asco (American Society of Clinical Oncology), ont montré la supériorité du schéma Folfox4 sur le schéma LV5FU2 (André *et al.*, 2004) avec un risque de rechute réduit de 23 % ( $p = 0,002$ ) à 3 ans. L'oxaliplatine a obtenu l'AMM pour le traitement adjuvant du cancer colique de stade III, d'abord aux Etats-Unis fin 2004 puis en Europe début 2005 (André and De Gramont, 2006).

À un stade d'évolution avancé, le cancer colorectal peut se propager dans la cavité péritonéale. L'exérèse chirurgicale suivie d'une chimiohyperthermie intrapéritonéale (CHIP) est devenue un traitement de référence de la carcinose péritonéale (Lim *et al.*, 2010). L'oxaliplatine chauffé à forte dose (460 mg/m<sup>2</sup>) est l'un des agents anticancéreux dont le bénéfice en application locale est le plus étudié (Elias *et al.*, 2004 ; Ripley *et al.*, 2010 ; Bouslimani *et al.*, 2010).

D'autres études cliniques internationales sont en cours concernant l'utilité de l'oxaliplatine dans d'autres localisations tumorales, notamment dans le cancer du pancréas, le cancer de l'estomac, les tumeurs génito-urinaires (Gunnlaugsson *et al.*, 2010 ; Okines *et al.*, 2010 ; Blesa *et al.*, 2010).

La tolérance clinique de l'oxaliplatine est plutôt favorable (Gamelin, 2004 ; Kweekel *et al.*, 2005). L'alopecie tant redoutée par les patients est rarement observée. La néphrotoxicité et l'ototoxicité, caractéristiques du cisplatine, sont insignifiantes. De rares cas de réactions allergiques ont été rapportés. Les troubles gastro-intestinaux (vomissements, nausées) sont efficacement contrôlés par l'administration d'antagonistes de la sérotonine (anti 5-HT<sub>3</sub>). Le risque de neutropénies dose-dépendant est élevé en association avec le 5FU mais ne nécessite ni l'espacement des cycles de chimiothérapie, ni l'arrêt du traitement. La neuropathie périphérique, effet secondaire courant des chimiothérapies à base de sels de platine, de taxanes et de vinca-alcaloïdes (Wolf *et al.*, 2008), se présente comme la toxicité limitante de l'oxaliplatine.

**Les composantes de la neurotoxicité de l'oxaliplatine et leur incidence.** L'oxaliplatine occasionne une neurotoxicité sensitive périphérique caractéristique, avec 2 composantes, l'une aiguë, l'autre chronique (Gamelin *et al.*, 2006). L'évaluation de la neurotoxicité de l'oxaliplatine repose sur l'examen clinique et l'utilisation d'une échelle de toxicité avec 4 grades, du moins au plus sévère. Une échelle spécifique (Tableau I-I) a été mise au point par Levi *et al.* (1993) et corrélée avec l'échelle standard NCI-CTCAE (National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria for Adverse Event).

La neuropathie aiguë est spécifique de l'oxaliplatine. Précoce, elle survient au cours ou au décours de la perfusion et dépend à la fois de la dose et du débit de perfusion. Elle se caractérise par des dysesthésies (sensations anormales et désagréables) aux extrémités (mains

et pieds) mais aussi aux régions péri-orales, linguales et pharyngolaryngées avec raucité de la voix et sensation d'étouffement. Ces dysesthésies sont déclenchées ou exacerbées au contact du froid. Elles sont parfois accompagnées de manifestations neuromusculaires telles que des contractures de la mâchoire, des crampes plus ou moins douloureuses, des engourdissements et une faiblesse musculaire pouvant gêner la marche. Très fréquente, la neuropathie aiguë touche 80 % des patients mais reste transitoire (limitée à quelques jours). Elle peut s'aggraver au fil des cycles de chimiothérapie (Gamelin *et al.*, 2006).

La neuropathie chronique ressemble à la neurotoxicité du cisplatine. D'évolution très lente et cumulative, elle fait suite à la neuropathie aiguë après administration répétée d'oxaliplatine (en moyenne après 6 mois de traitement, après une dose cumulée de 780-850 mg/m<sup>2</sup>, Balayssac *et al.*, 2011) et persiste entre les cures. Il s'agit de paresthésies (fourmillements) aux extrémités s'accompagnant d'une gêne fonctionnelle dans les gestes fins de la vie quotidienne (écriture, boutonnage, couture). Le risque de survenue de la neuropathie chronique dépend du patient et de la dose totale cumulée (Gamelin *et al.*, 2006). Dans l'étude de Gramont *et al.* (2000) comparant en situation métastatique le schéma LV5FU2 au schéma Folfox4, l'incidence de la neuropathie de grade 3 était globalement de 18 %, de 10 % après 9 cycles, de 25 % après 12 cycles et de 50 % après 14 cycles. Dans l'étude Mosaic utilisant Folfox4 en situation adjuvante, les neuropathies de grade 3 survenaient en cours de traitement dans 12 % des cas. La neuropathie chronique est le plus souvent réversible, contrairement à la neurotoxicité du cisplatine, mais la récupération de la sensibilité est lente. Ainsi 6 % des patients avaient encore un grade 3 à 6 mois de la fin du traitement, 3 % à 1 an et 0,5 % à 18 mois. La neuropathie peut également survenir en décalé puisque 12 patients ont connu un grade 3 après la fin du traitement, dont 6 en souffraient encore à 1 an (Tournigand and de Gramont, 2006).

**La pathogénie de la neurotoxicité de l'oxaliplatine.** Les mécanismes soulignant les effets toxiques de l'oxaliplatine, agent antiprolifératif, sur les neurones périphériques, qui sont des cellules post-mitotiques, n'ont pas été totalement élucidés.

Au vu des symptômes à la fois sensoriels et neuro-moteurs, signes d'hyperexcitabilité, le syndrome aigu a été associé à une altération des propriétés des canaux ioniques voltage-dépendant (Adelsberger *et al.*, 2000). Notre équipe a mis en avant le rôle de l'oxalate, le ligand hydrolysable de la molécule d'oxaliplatine (Grolleau *et al.*, 2001). L'étude

électrophysiologique menée sur un modèle de neurones DUM (dorsal unpaired median) de blatte a montré que l'application intracellulaire d'oxaliplatine ainsi que d'acide oxalique (oxalate) et de BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), agent chélateur des ions calcium, diminuait l'amplitude du courant sodique entrant voltage-dépendant, résultant en une réduction de moitié de l'amplitude du potentiel d'action. L'effet n'était pas reproduit par le dichloro-DACH-platine ni par le cisplatine. La neurotoxicité aiguë caractéristique de l'oxaliplatine a ainsi été attribuée au blocage des canaux sodium voltage-dépendant sensibles au calcium, via la chélation des ions calcium intracellulaires par l'oxalate libéré au cours de l'hydrolyse du médicament, altérant ainsi la conduction nerveuse. L'implication des canaux sodium voltage-dépendant de la membrane axonale a été confirmée chez des patients traités par l'oxaliplatine (Krishnan *et al.*, 2005 ; Krishnan *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2011). D'autre part, la sensibilité au froid associée à la neurotoxicité de l'oxaliplatine a dernièrement été corrélée chez le rat à la sur-expression du gène *TRPM8* (Transient receptor potential melastatin 8) dans les ganglions de la racine dorsale (Gauchan *et al.*, 2009).

La neuropathie chronique purement sensitive de l'oxaliplatine semble être liée à l'accumulation préférentielle du platine au sein des ganglions de la racine dorsale, ceux-ci n'étant pas protégés par la barrière hémato-encéphalique (Cavaletti *et al.*, 2001 ; Ta *et al.*, 2006 ; McWhinney *et al.*, 2009). Diverses modifications morphologiques et fonctionnelles de ces ganglions ont été mises en évidence. L'examen histologique chez le rat a montré une atrophie sélective des corps cellulaires ganglionnaires (Jamieson *et al.*, 2005) ainsi qu'une altération du cytosquelette neuronal dans les ganglions (Jamieson *et al.*, 2009) et les nerfs sciatiques (Meyer *et al.*, 2011). Une toxicité axonale a été mise en cause via l'interruption des transports antérogrades et rétrogrades dans les neurones périphériques (Goshima *et al.*, 2010), associée à un déficit énergétique (Argyriou *et al.*, 2008). Au niveau moléculaire, Liu *et al.* (2009) ont révélé que le transporteur de cuivre CTR1, utilisé dans le transport actif des sels de platine (Ishida *et al.*, 2002 ; Holzer *et al.*, 2004), était fortement exprimé à la membrane neuronale dans les ganglions de la racine dorsale de rat. Scuteri *et al.* (2009) ont montré *in vitro* que l'oxaliplatine induisait l'apoptose des neurones ganglionnaires par un mécanisme impliquant les MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases p38 et ERK1/2 (Extracellular signaling-Regulated Kinase, p44/42).

Très invalidante, la neurotoxicité de l'oxaliplatine retentit sur la qualité de vie des patients conduisant régulièrement le clinicien à abaisser la dose d'oxaliplatine, à espacer les cycles de chimiothérapie et même à interrompre le traitement pourtant efficace. Aussi, plusieurs

approches thérapeutiques ont été tentées pour prévenir ou traiter les neuropathies périphériques liées à l'oxaliplatine.

**Les options de neuroprotection.** Plusieurs options ont été envisagées pour lutter contre la neuropathie aiguë liée à l'oxaliplatine.

Une approche non pharmacologique de prévention vise à informer les patients d'éviter de sortir en hiver sans protection et d'ingérer des boissons ou aliments froids les quelques jours qui suivent la perfusion d'oxaliplatine.

Des molécules agissant sur les canaux sodium ont été évaluées, telles la carbamazépine ou la gabapentine (Gamelin *et al.*, 2006).

L'utilité des perfusions de calcium/magnésium avant et après administration de l'oxaliplatine a été testée au CRLCC Paul Papin dans une étude rétrospective (Gamelin *et al.*, 2004), après que notre équipe a montré le rôle de l'oxaliplatine (oxalate) et de l'altération de l'homéostasie calcique dans le blocage des canaux sodium voltage-dépendant (Grolleau *et al.*, 2001). Cette étude portait sur 161 patients ayant un cancer colorectal avancé et soignés par le régime FOLFOX. Parmi les 161 patients, 96 ont reçu du gluconate de calcium/sulfate de magnésium (1 g) avant et après la perfusion d'oxaliplatine (groupe Ca/Mg) et 65 patients n'en ont pas reçu. Seuls 4% des patients ont développé une neurotoxicité dans le groupe Ca/Mg contre 31% dans le groupe contrôle, avec un taux de réponse au traitement similaire dans les 2 groupes. Les paresthésies distales, linguales et pharyngolaryngées étaient moins fréquentes et moins sévères, indiquant que les perfusions de Ca/Mg réduisent l'incidence et l'intensité de la neuropathie aiguë. De plus, les perfusions de Ca/Mg permettent des traitements plus prolongés, avec respect de la dose.

Des options ont été envisagées pour lutter contre la neuropathie chronique liée à l'oxaliplatine.

Une modification du mode d'administration de l'oxaliplatine a été proposée. La stratégie repose sur le concept de pause thérapeutique. Une courte série de cycles de chimiothérapie est effectuée en arrêtant l'oxaliplatine avant qu'une neuropathie chronique ne survienne, puis l'oxaliplatine est réintroduit (Tournigand and de Gramont, 2006).

Un agent de détoxification des métaux lourds a été testé, le glutathion, au vu de son potentiel à bloquer l'accumulation du platine au sein des ganglions de racine dorsale. Milla *et al.* (2009) ont montré que l'administration de glutathion permettait de réduire la neurotoxicité chronique de l'oxaliplatine, sans altérer ni les propriétés pharmacocinétiques du médicament, ni la formation d'adduits Pt-ADN.

L'impact des perfusions de Ca/Mg, avant et après administration de l'oxaliplatine, sur la neurotoxicité chronique s'est aussi montré significatif dans l'étude rétrospective de Gamelin *et al.* (2004). A la fin du traitement, 20% des patients du groupe Ca/Mg avaient une neuropathie contre 45% dans le groupe contrôle, laissant à penser que les perfusions de Ca/Mg retardent le développement de la neurotoxicité chronique. L'utilisation systématique du Ca/Mg semble toutefois controversée. En effet, des études ont montré un effet néfaste des perfusions de Ca/Mg sur l'efficacité du traitement. Notamment, l'essai thérapeutique CONcePT (Combined Oxaliplatin Neuropathy Prevention Trial) s'est arrêté prématurément car les patients qui recevaient du Ca/Mg associé au régime FOLFOX présentaient des taux de réponse tumorale significativement diminués par rapport aux patients traités par FOLFOX seul (Hochster *et al.*, 2007). Finalement, la réanalyse des résultats de l'étude CONcePT n'a démontré aucune activité antitumorale inférieure dans le groupe Ca/Mg (Grothey *et al.*, 2011).

Il n'existe à ce jour aucune molécule qui protège totalement contre la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

**Vers la recherche de biomarqueurs.** En plus des efforts menés pour identifier un agent neuroprotecteur efficace, des travaux visant à mettre en évidence des biomarqueurs de la neurotoxicité de l'oxaliplatine ont été entrepris.

Cavaletti *et al.* (2002) ont montré chez le rat une association entre la neuropathie chronique liée à l'oxaliplatine et la baisse du taux circulant du facteur de croissance neuronal NGF (Nerve Growth Factor).

Park *et al.* (2009) ont étudié la variation des paramètres d'excitabilité axonale chez 58 patients traités par l'oxaliplatine. Ils ont pu observer à la fin du traitement, que les patients ayant développé une neurotoxicité sévère étaient aussi ceux dont les paramètres d'excitabilité étaient les plus modifiés. Une augmentation d'au moins 15% de l'excitabilité axonale a été observée chez 80% des patients ayant une neuropathie de grade 2 ou 3 mais chez aucun des

patients ayant une neuropathie de grade 1. Les anomalies d'excitabilité apparaissant en moyenne au bout de 3,7 cycles de chimiothérapie, les auteurs proposent que le suivi des paramètres d'excitabilité axonale pourrait permettre de détecter précocément tout dysfonctionnement neuronal induit par l'oxaliplatine et de prévenir le développement d'une neuropathie chronique sévère.

Afin d'identifier des marqueurs génétiques de réponse individuelle à l'oxaliplatine, des études pharmacogénétiques ont été conduites. Quelques polymorphismes génétiques ont été corrélés au développement de neuropathie du médicament.

La famille des enzymes Glutathione S-transférases (GST) catalyse la conjugaison de glutathion sur les toxines, permettant ainsi leur élimination des cellules. Ces enzymes participent au mécanisme de détoxification des métaux. Plusieurs études menées sur des patients ayant un cancer colorectal avancé traité par l'oxaliplatine ont porté sur l'observation des polymorphismes des gènes *GSTM1*, *GSTT1* et *GSTP1*. Une étude portant sur 64 patients (Lecomte *et al.*, 2006) a mis en évidence une association spécifique entre le polymorphisme du gène *GSTP1* (Ile105Val), soit l'allèle *GSTP1*-105 A, et la neuropathie chronique. Au contraire, Ruzzo *et al.* (2007) ont présenté, à partir d'une cohorte de 166 patients, une association entre l'allèle *GSTP1*-105 G et le développement d'une neuropathie de grade 3. Une autre étude (Kweekel *et al.*, 2009), menée sur 91 patients, a quant à elle rejeté toute association entre le polymorphisme du gène *GSTP1* (Ile105Val) et la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

Gamelin *et al.* (2007) se sont intéressés à la voie de synthèse de l'oxalate, en particulier au gène *AGXT* codant pour l'enzyme Glyoxylate aminotransférase, chez 135 patients traités par l'oxaliplatine. L'haplotype mineur s'est révélé associé à la fois à la neurotoxicité aiguë et à la neurotoxicité chronique de l'oxaliplatine.

Récemment, dans une étude portant sur 55 patients, le polymorphisme du gène *ITGB3* (L33P) de l'Intégrine beta-3 a été associé non pas au développement de la neuropathie périphérique chronique induite par l'oxaliplatine mais à sa sévérité (Antonacopoulou *et al.*, 2010).

Argyriou *et al.* (2009) ont testé sans succès, chez 62 patients, l'hypothèse d'une association entre le polymorphisme du gène *SCN2A* (R19K), codant pour un canal sodium potentiel-dépendant, et la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

D'autres analyses réalisées sur des cohortes de patients plus grandes sont indispensables pour juger de l'intérêt de ces polymorphismes génétiques à prédire la toxicité neurologique de l'oxaliplatine.

Une autre approche apparaît intéressante pour découvrir des biomarqueurs de la neurotoxicité de l'oxaliplatine, la protéomique.

## **La percée de la protéomique en clinique**

La révolution génomique marque indéniablement un tournant en diagnostique et en thérapeutique (Huang and Dolan, 2010). Néanmoins, la connaissance des séquences des gènes ne peut suffire à répondre aux besoins de biomarqueurs associés aux maladies (souvent multigéniques) ou aux phénomènes de résistance et de toxicité liés aux médicaments (Bailey *et al.*, 2001).

Le génome ne représente, en effet, que le premier niveau de complexité du vivant. Les fonctions biologiques ne sont pas régulées ni médiées par le génome, mais principalement par la population dynamique des produits géniques que sont les protéines qui représentent aussi souvent des cibles médicamenteuses. Les protéines étant directement impliquées dans les processus biochimiques normaux et pathologiques, l'analyse des altérations protéiques doit ainsi permettre de mettre en évidence les voies biologiques dérégulées.

La protéomique se présente donc comme une discipline complémentaire à la génomique, incontournable pour l'étude fonctionnelle des gènes, dont le développement technologique et méthodologique a été encouragé par les applications prometteuses des biomarqueurs protéiques en diagnostique médical et en pharmacologie.

"The future belongs to proteomics" (S. Fields, Science, 2001).

## *De l'importance du protéome à l'avènement de la protéomique*

**Le protéome originel.** Le terme a été proposé pour la première fois, avec succès, par Marc Wilkins lors du congrès sur l'électrophorèse 2D à Sienne (Italie) en 1994. Dans son acception originelle et par analogie de termes, le PROTEome renvoie à "l'ensemble des protéines exprimées par un génOME, une cellule ou un tissu" (Wasinger *et al.*, 1995 ; Wilkins *et al.*, 1996). Pour l'anecdote, cette phrase était si longue et inélégante que Wilkins, qui travaillait alors sur sa thèse à l'Université australienne Macquarie, ne tarda pas à se lasser de l'écrire. En quête du mot qui traduirait le mieux "le complément protéique du génome", il opta pour "protéome" qui sonnait mieux que "protéinome" ou encore "protome" (Huber, 2003 ; Cohen, 2001).

La définition s'est ensuite complexifiée pour rendre compte de la grande dynamique qui caractérise le protéome et l'oppose fondamentalement au génome, collection de gènes assez stable, à l'exception des événements mutationnels (rares) et épigénétiques.

**La dynamique du protéome.** Au sein de chaque cellule d'un organisme, le contenu en protéines se trouve continuellement modifié selon que les gènes sont activés ou non en fonction des conditions intra- ou extracellulaires. Le protéome représente donc la composition des protéines exprimées dans une unité biologique (un organisme, un organe, un tissu, une cellule, un sous-compartiment cellulaire) à un instant donné dans un environnement particulier. Aussi à un génome ne correspond pas un unique protéome mais une myriade de protéomes. C'est ainsi que la chenille et le papillon qui possèdent un génome identique et se distinguent uniquement par la sélection des protéines exprimées ou non sont devenus l'emblème de la protéomique. Au cours du développement, les cellules d'un individu avec le même génome sont capables de se différencier en différents types tissulaires par l'expression de protéomes caractéristiques. Au sein des systèmes biologiques, les protéines établissent le lien entre l'information codée du génome (le génotype) et l'expression labile de cette information (le phénotype).

D'une part, la dynamique du protéome se manifeste quantitativement. La fluctuation du taux d'une protéine, dépendamment du type cellulaire et de l'état physiologique, est le fait de plusieurs mécanismes de régulation concernant la traduction elle-même, le trafic d'un

compartiment cellulaire à un autre ou encore le turn-over, les protéines ayant, selon leur rôle, des temps de demi-vie différents (Pratt *et al.*, 2002). De plus, la dynamique de concentrations, c'est-à-dire le rapport de concentrations entre les protéines les moins abondantes et les protéines les plus abondantes, est large, d'un facteur  $10^6$ - $10^8$  au sein des cellules et tissus (Anderson and Anderson, 1998 ; Rabilloud, 2002 ; Ly and Wasinger, 2011) et jusqu'à  $10^{12}$  dans les biofluides comme le plasma sanguin (Corthals *et al.*, 2000 ; Anderson and Anderson, 2002 ; Hortin and Sviridov, 2010).

D'autre part, la dynamique du protéome se manifeste qualitativement. Chez l'Homme, 40-79% des gènes poly-exoniques génèrent en moyenne 2 à 3 transcripts, conséquence de l'épissage alternatif des pré-ARN messagers (Nakao *et al.*, 2005). Ainsi chaque gène peut produire jusqu'à 3 protéines isoformes avec des fonctions très différentes ou légèrement modulées (Stamm *et al.*, 2005). Suite à la traduction, la plupart des protéines font l'objet de modifications post-traductionnelles (MPT) transitoires, consistant le plus souvent en l'ajout de groupements chimiques covalents, dont plus de 350 ont été répertoriées à ce jour (Delta Mass Database, <http://www.abrf.org> ; RESID Database, <http://www.ebi.ac.uk/RESID/>), telles la phosphorylation, la glycosylation, la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la palmitoylation, la sulfatation, l'oxydation, ou encore le clivage. L'assortiment des MPT sur une protéine constitue un code moléculaire affectant de manière critique sa stabilité, sa conformation, sa distribution sub-cellulaire, sa capacité d'interaction et enfin son activité biologique. L'exemple classique de modification complexe et multi-sites, rappelée par Jensen (2006) est le "code des histones" qui régule la structure et la fonction des nucléosomes durant la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. Différents acides aminés des histones sont précisément méthylés, acétylés, phosphorylés et ubiquitinés, ce qui module leur interaction avec les acides nucléiques et d'autres protéines régulatrices. Un autre déterminant de la dynamique du protéome concerne justement l'organisation des protéines en réseaux multiprotéiques fugaces très diversifiés dont, par exemple, 500-550 ont été cartographiés chez la levure (Gavin *et al.*, 2006 ; Krogan *et al.*, 2006). Ces complexes protéiques sont essentiels au fonctionnement cellulaire, en particulier au contrôle des voies de signalisation.

Par conséquent, l'hétérogénéité des protéines se trouve augmentée, si bien que le protéome est une entité hautement complexe comprenant davantage de protéines que le génome de gènes. Tandis que le génome humain devrait révéler un maximum de 23000 cadres ouverts de lecture (21598 ont été identifiés à ce jour, Ensembl v60.37e, octobre 2010, <http://www.ensembl.org>), l'HPI (The UniProtKB/Swiss-Prot Human Proteome Initiative) a estimé qu'un individu

pourrait exprimer jusqu'à 1 million de polypeptides différents (<http://www.expasy.ch/sprot/hpi/>). Comme le suggèrent Ahrens *et al.* (2010), le dogme de Beadle and Tatum (1941) "un gène → un polypeptide" devrait être reconsidéré et laisser place à la définition suivante: "un gène est l'union de séquences codant une série cohérente de produits fonctionnels potentiellement chevauchants" (Gerstein *et al.*, 2007).

**La spéciation protéique.** La formule "expression protéique" introduite par Wilkins dans sa définition du protéome ne devrait donc pas se limiter au seul contexte de la synthèse d'une protéine mais intégrer aussi la notion que celle-ci est modifiée (Jungblut *et al.*, 2008). Chaque modification d'une protéine est à l'origine d'une nouvelle espèce protéique avec une fonction spécifique. Si le terme "protéine" se réfère au produit polypeptidique issu de la traduction, il doit recouvrir aussi l'ensemble de ses différentes espèces. Il s'agit du concept de "spéciation protéique" où l'espèce protéique représente la plus petite unité du protéome (Jungblut *et al.*, 1996).

*Le protéome d'un individu se définit donc par la somme de toutes les espèces protéiques créées tout au long de sa vie ; la composition des espèces protéiques dans une unité biologique (un organe, un tissu, une cellule, un sous-compartiment cellulaire) à un instant donné dans un environnement particulier est qualifiée de sous-protéome (Jungblut et al., 2008).*

Ainsi l'analyse d'une séquence ADN ne peut prédire la forme active d'une protéine. De même, la quantité d'un ARN messager n'est pas toujours corrélée avec le niveau réel de la protéine correspondante (Gygi *et al.*, 1999 ; Rogers *et al.*, 2008). C'est pourquoi seule l'observation directe des protéines, fournit un cliché objectif et concret de l'état d'une cellule. Au vu de la complexité des protéomes, leur analyse reproductible représente un défi à la fois technologique et méthodologique.

**La genèse de la protéomique.** Le dessein d'étudier globalement les protéines d'un organisme remonte aux années 70 avec la séparation par électrophorèse 2D d'un millier de molécules de

la bactérie *E. coli* visualisées sous forme de spots protéiques après coloration du gel (O'Farrell, 1975). Toutefois, à l'époque, lorsque la caractérisation immunologique préjugée des spots ne pouvait être pratiquée, l'identification des protéines était laborieuse, le classique séquençage d'Edman, certes fiable, étant lent. L'électrophorèse 2D était alors une technique essentiellement descriptive. Les catalogues de spots ont ainsi constitué les premières bases de données protéiques (Pandey and Mann, 2000).

Les années 90 ont marqué un tournant décisif avec la mise au point de 2 procédures d'ionisation douce en spectrométrie de masse (SM), reconnues par le Prix Nobel de Chimie 2002 pour John B. Fenn et Koichi Tanaka, rendant possible l'analyse sensible et rapide des biomolécules (Tanaka *et al.*, 1988 ; Fenn *et al.*, 1989). Aussi, lorsque les premiers génomes ont été complètement séquencés et que l'ensemble des séquences codantes ont été déposées dans des bases de données publiques, une autre ère a été rapidement présagée, celle de la post-génomique (James, 1997). L'adaptation des spectromètres de masse à la biologie, le développement des outils bioinformatiques et la miniaturisation des systèmes de séparation des biomolécules ont été les moteurs d'une nouvelle discipline de la recherche en biologie: la protéomique.

***La protéomique est l'approche systématique, à l'échelle de protéomes entiers ou de sous-protéomes, de l'analyse des protéines. La protéomique est aussi l'ensemble des technologies et méthodologies toujours plus innovantes mises en œuvre en vue de cette analyse.***

**Le concept de la protéomique.** Jusqu'alors, la recherche en biologie suivait plutôt une démarche réductionniste (Lescuyer *et al.*, 2004) où une hypothèse ne concernant que quelques protéines ciblées était testée par une approche spécialisée (biologie moléculaire, biochimie). A l'instar des autres disciplines en -omique, la protéomique propose une démarche différente, dite globaliste, ayant été imagée par Fields (2001) sous forme d'une "expédition de pêche au chalut" (Figure I-4). Des protéines, en très grand nombre, sont simultanément caractérisées sans connaissance *a priori* de leur identité, puis triées selon leur pertinence. Générant de volumineuses collections de données, la protéomique se présente donc comme une formidable "machine à générer des hypothèses" (Cravatt *et al.*, 2007), pouvant offrir de nouvelles

perspectives en biologie, hors des sentiers battus. L'équilibre entre ces 2 types de démarche scientifique, réductionniste et globaliste, conditionne aujourd'hui la progression du savoir.

La protéomique contribue activement au champ de la biologie intégrative (biologie des systèmes) qui appréhende la complexité des systèmes biologiques de manière globale, par l'intégration des données moléculaires transdisciplinaires (Chakravarti *et al.*, 2010). Cette conception révolutionne les sciences du vivant et de la santé (Weston and Hood, 2004).

**Les enjeux de la protéomique.** La protéomique connaît un incroyable essor depuis une quinzaine d'années dans tous les domaines des sciences biologiques, d'autant que de plus en plus de séquences codantes sont disponibles avec 1566 génomes déposés à ce jour (GOLD Genomes OnLine Database v3.0, janvier 2011, <http://www.genomesonline.org>). Témoin de ce succès le nombre de journaux scientifiques s'ouvrant à la discipline et l'augmentation exponentielle du nombre de publications originales s'y rapportant (Figure I-5). Dans un rapport paru en 2009 (référence BIO034B), le cabinet BCC Research, spécialiste des études de marchés high-tech, a évalué à 6,7 milliards de dollars le marché global de la protéomique en 2008 et l'a estimé à 19,4 milliards de dollars en 2014.

Outre la compréhension fondamentale des mécanismes biologiques, la protéomique offre des applications qui intéressent à la fois les laboratoires académiques et l'industrie. Certains secteurs devraient profiter à plus ou moins long terme des retombées de la protéomique comme ceux de l'agroalimentaire (Pischetsrieder and Baeuerlein, 2009 ; Kussmann *et al.*, 2010) et de la santé humaine. A été initié un projet de grande ampleur dédié au protéome humain, l'HPP (Human Proteome Project), sous l'égide d'une organisation mondiale coordinatrice, l'HUPO (HUman Proteome Organisation), créée en 2001 sur le modèle de l'HUGO (HUman Genome Organisation) pour promouvoir la protéomique en médecine et stimuler les coopérations internationales (Hanash and Celis, 2002). En 2009 aux USA, l'Institut National de la Santé (National Institutes of Health, NIH) a consacré un budget total de 375,5 millions de dollars à la protéomique en subventionnant 1026 projets (NIH RePORTER Database, <http://projectreporter.nih.gov/reporter.cfm>).

Le plus grand enjeu de la protéomique clinique concerne sans conteste la découverte de biomarqueurs et la médecine personnalisée (Beretta, 2007) avec un marché particulièrement

porteur en pharmaceutique, celui de la sécurité des médicaments (Lockhart and Walther, 2009 ; D'Alessandro and Zolla, 2010).

**Les différentes approches protéomiques.** Face à la complexité des protéomes, la voie de la protéomique est empruntée afin de répondre à 4 problèmes principaux: quelles protéines sont présentes? Quelle est l'abondance relative des protéines présentes? Quelles modifications sont présentes sur les protéines? Avec quelles autres partenaires s'associe une protéine? Chacune de ces questions appelle à suivre un raisonnement particulier dont dépendent l'organisation de l'expérience et le choix stratégique des techniques à appliquer. Se distinguent l'approche comprehensive, l'approche à grande échelle et l'approche focalisée (Mallick and Kuster, 2010).

L'approche comprehensive est typiquement de nature qualitative et vise à lister l'ensemble des protéines. Laborieuse, elle réclame la participation de plusieurs laboratoires durant de nombreuses années. Par exemple, le projet concernant le protéome plasmatique (PPP: Plasma Proteome Project) piloté par l'HUPO ambitionne de créer une base de données publique répertoriant les protéines et peptides présents dans le plasma humain (Omenn *et al.*, 2005).

L'approche à grande échelle ne cherche pas l'exhaustivité mais tend à analyser de manière globale ou sélective des centaines (des milliers) de protéines pendant plusieurs semaines. L'approche est globale pour établir un profil d'expression des protéines en réponse à une perturbation. Entre autres, la résistance au docetaxel a ainsi été étudiée (Zhao *et al.*, 2009) de même que l'hépatotoxicité de l'ecstasy (Moon *et al.*, 2008). L'approche est sélective lorsque l'intérêt est porté sur une fraction du protéome, tel le glyco- ou le phospho-protéome. Par exemple, Li *et al.* (2010), en mettant en évidence les voies de signalisation activées dans le cancer du poumon, ont révélé des cibles fonctionnelles du dasatinib.

Enfin, l'approche focalisée concerne l'identification des protéines formant un complexe avec une protéine cible par copurification des dizaines de partenaires d'interaction. La pathogenèse de la maladie d'Alzheimer a été récemment appréhendée par cette approche en cartographiant les protéines liées à l'amyloïde-bêta oligomérique (Virok *et al.*, 2011).

**Le rôle-clé de la spectrométrie de masse.** L'identification en masse des protéines est l'étape cruciale de toute approche protéomique. Après que les protéines ont été digérées par une protéase séquence-spécifique, en général la trypsine, les peptides résultant sont séquencés par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM). Le principe général de l'analyse est le suivant. Tout d'abord, les peptides sont séparés en fonction de leur masse respective, puis un à un sont sélectionnés et fragmentés. Les fragments sont à leur tour séparés en fonction de leur masse respective, fournissant des éléments de séquence en acides aminés. S'en suit alors une analyse bioinformatique indispensable au vu de la quantité d'informations générées à l'aide, par exemple, de l'algorithme de recherche très utilisé Mascot (Perkins *et al.*, 1999). Chaque pattern de fragmentation obtenu est comparé aux patterns de fragmentation théoriques (de peptides précurseurs de même masse) construits *in silico*, à partir des séquences protéiques prédites des séquences génomiques, et répertoriés dans les bases de données protéiques telle UniProtKB/Swiss-Prot. Ainsi, à un pattern de fragmentation est associé le peptide, identifié par sa séquence en acides aminés (une séquence de 8 à 10 acides aminés est typiquement unique dans un protéome), dont le score de confiance est le plus élevé (Sadygov *et al.*, 2004). Selon "la règle des 2 peptides" (Carr *et al.*, 2004), la combinaison d'au moins 2 peptides conditionne l'identification d'une protéine.

La spectrométrie de masse (SM) mesure à proprement parler le ratio masse/charge ( $m/z$ ) d'ions en phase gazeuse. Un spectromètre de masse est essentiellement constitué de 3 modules. Dans la source d'ionisation, les peptides sont sublimés ou vaporisés et ionisés. Dans l'analyseur de masse, les ions sont analysés en fonction de leur ratio  $m/z$ . Enfin, le détecteur enregistre un spectre de masse représentant le nombre d'ions pour chaque valeur  $m/z$  sous la forme de différents pics. En protéomique, sont utilisées les procédures de désorption laser assistée par matrice (MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) et d'électronebulisation (ESI: ElectroSpray Ionization) permettant l'ionisation douce, sans les fragmenter, des biomolécules (Tanaka *et al.*, 1988 ; Fenn *et al.*, 1989). Plusieurs configurations d'analyseurs de masse, le temps de vol (TOF : Time-Of-Flight), le quadrupôle, la trappe ionique, l'orbitrap se distinguent par leur sensibilité, leur résolution, leur précision, importants paramètres conditionnant leur utilisation en fonction de l'approche protéomique (Aebersold and Mann, 2003 ; Domon and Aebersold, 2006 ; Han *et al.*, 2008 ; Yates *et al.*, 2009 ; Walther and Mann, 2010). Dans la configuration TOF/TOF, deux analyseurs de masse TOF disposés en série et séparés par une chambre de dissociation (fragmentation) permettent le séquençage des peptides par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM ou SM<sup>2</sup>).

**Le déroulement multi-étapes d'une analyse protéomique.** L'analyse des protéines à l'échelle d'un protéome nécessite toute une chaîne instrumentale à haut débit (et automatisée) ainsi qu'une méthodologie multi-étapes, de la préparation de l'échantillon biologique à l'interprétation des données protéiques.

Compte-tenu de l'investissement temporel et financier que représente toute analyse protéomique, le plan expérimental doit être réfléchi en amont quant au modèle biologique à interroger et au nombre de réplicats biologiques à préparer, incluant les témoins. Ce préambule conditionne la signification biologique et statistique de l'expérience. Des échantillons de sources biologiques variées peuvent être étudiés, des coupes tissulaires, des fluides biologiques, des cellules en culture, des surnageants de culture. La préparation de l'échantillon est critique, il n'existe toutefois aucune méthode universelle. L'optimisation, déterminante, de l'extraction des protéines, en particulier des protéines membranaires/hydrophobes, se heurte à la nécessaire compatibilité des réactifs utilisés (détergents, chaotropes) avec l'étape suivante de l'analyse du mélange complexe de protéines obtenu (Bodzon-Kulakowska *et al.*, 2007).

La caractérisation des protéines obtenues par spectrométrie de masse reposant sur le séquençage des peptides les composant, la conversion des protéines en peptides est centrale à toute analyse protéomique. Aussi, deux grandes approches peuvent être envisagées (Han *et al.*, 2008 ; Yates *et al.*, 2009). Selon l'approche dite "top-down", la digestion trypsique est réalisée après que le mélange complexe de protéines intactes a été fractionné. L'approche dite "bottom-up" ("shotgun") consiste en la digestion trypsique en solution du mélange complexe de protéines suivie du fractionnement du mélange encore plus complexe de peptides générés. La réduction de la complexité d'un échantillon protéique ou peptidique par plusieurs étapes de fractionnement est un pré-requis indispensable à l'analyse par spectrométrie de masse. Cela permet d'identifier davantage de peptides/protéines en améliorant la détection de protéines plus faiblement concentrées dans l'échantillon biologique, de quoi favoriser la découverte de biomarqueurs (voir le chapitre "L'amélioration de la couverture protéomique par fractionnement multidimensionnel").

Une étape supplémentaire de quantification relative des protéines offre la possibilité de comparer plusieurs protéomes à la fois afin de révéler les protéines dont le niveau d'expression est altéré suite à une perturbation. La protéomique quantitative différentielle est particulièrement utile lors de la recherche de biomarqueurs mais aussi en biologie

fonctionnelle, informant sur la régulation des processus biochimiques et les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire (voir le chapitre "La protéomique quantitative différentielle").

Un projet en protéomique ne s'arrête pas à l'étape d'analyse par spectrométrie de masse. Au contraire, une fois que les protéines ont été identifiées, s'en suit un minutieux travail d'interprétation des données. Les informations pertinentes quant à la question biologique posée doivent être extraites de listes entières de protéines. Pour accompagner les biologistes dans cette tâche, des centaines de bases de données protéiques et d'outils bioinformatiques en libre accès ou payants ont été développés (Malik *et al.*, 2010). L'annotation des protéines identifiées par l'intermédiaire de l'ontologie génique (Gene Ontology, GO) constitue souvent la première étape du tri des données. L'ontologie génique décrit les produits géniques à l'aide d'une terminologie biochimique normalisée (Ashburner *et al.*, 2000), permettant de détecter à partir d'une liste de protéines, les rôles biologiques, fonctions moléculaires et localisations cellulaires sur- et sous-représentées. La base DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery ; Dennis *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2009 ; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) s'est imposée comme un puissant outil d'annotation (Malik *et al.*, 2010). Les étapes suivantes du tri des données consistent généralement en l'étude des interactions entre les protéines à l'aide, par exemple, de la méta-base STRING (Search Tool for the Retrieval of INteracting Genes/proteins ; von Mering *et al.*, 2003, Jensen *et al.*, 2009 ; <http://string-db.org/>) et en l'étude des voies biologiques reconstituées à l'aide, par exemple, de la base KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ; <http://www.genome.jp/kegg/>). L'ensemble de ces ressources bioinformatiques, sans la supplanter, permettent de guider l'analyse bibliographique qui demeure indispensable pour sélectionner les protéines d'intérêt. Ces dernières font alors l'objet d'expériences complémentaires afin de transcrire l'information protéomique en connaissance biologique.

## ***L'amélioration de la couverture protéomique par fractionnement multidimensionnel***

**Les défis liés à l'analyse protéomique d'échantillons biologiques.** La protéomique doit idéalement permettre la caractérisation de l'ensemble des protéines qui composent un échantillon. Cet objectif s'oppose à 3 limites imposées par la biologie, qui constituent autant de défis à relever: la dynamique de concentrations, la complexité qualitative auxquelles s'ajoute l'impureté de l'échantillon biologique. En effet, un échantillon protéique est souvent contaminé par d'autres macromolécules biologiques telles que les acides nucléiques ou les lipides, par des interférents chimiques (sels, détergents...), ou encore par d'autres protéomes. Ainsi, l'ajout d'un sérum animal au milieu de culture de cellules *in vitro* compromet la pureté d'un sécrétome.

De plus, lors de l'analyse par spectrométrie de masse l'efficacité d'ionisation des peptides varie, ce qui contribue à l'effet dit de suppression d'ions. Les peptides issus de la digestion des protéines entrent en compétition au cours du processus d'ionisation et la détection des peptides les moins abondants ou qui s'ionisent le moins bien se trouve défavorisée. En outre, la couverture protéique, c'est-à-dire le taux de peptides tryptiques détectés par protéine n'est jamais de 100% même pour les protéines les plus abondantes (Kuster *et al.*, 2005 ; Mallick *et al.*, 2007). Les protéines les moins concentrées sont souvent représentées par 1 peptide unique, ce qui affecte la confiance statistique des résultats.

Afin d'améliorer la couverture protéomique, c'est-à-dire le taux de protéines différentes identifiées de manière significative au sein d'un échantillon biologique, plusieurs stratégies ont été proposées. L'analyse répétée d'un même échantillon par injection multiple s'est montrée efficace (Liu *et al.*, 2004 ; Shen *et al.*, 2004 ; Tabb *et al.*, 2010) de même que l'analyse répétée d'un même échantillon par SM après exclusion des masses des précurseurs déjà identifiés (Schmidt *et al.*, 2008 ; Hoopmann *et al.*, 2009). L'utilisation combinée de la trypsine et d'autres protéases avec des spécificités de clivage différentes améliore aussi la couverture protéomique (Swaney *et al.*, 2010). L'échantillon peut aussi être simplifié par la sélection d'un type cellulaire, d'un sous-compartiment cellulaire ou encore d'une classe de protéines ou de peptides par affinité. L'immunodéplétion appliquée à l'analyse protéomique du plasma humain en est un exemple. L'enrichissement des phosphoprotéines ou

phosphopeptides, des glycoprotéines ou glycopeptides a de même fait l'objet de nombreuses revues protéomiques (Thingholm *et al.*, 2009 ; Pan *et al.*, 2010). Une approche particulièrement efficace pour réduire la complexité d'un échantillon et augmenter la couverture protéomique consiste en le fractionnement du protéome.

**La réduction de la complexité des échantillons protéiques/peptidiques par fractionnement multidimensionnel.** Plusieurs stratégies de fractionnement peuvent être appliquées à un échantillon en fonction de différents paramètres physico-chimiques (poids moléculaire, pI, indice d'hydrophobie) des protéines intactes ou des peptides générés par la digestion trypsique des protéines le composant. Il en résulte un effet de concentration des analytes dans une fraction particulière en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, de quoi faciliter la détection des protéines/peptides les moins représentés dans un échantillon.

Il apparaît qu'aucune stratégie de fractionnement n'est supérieure aux autres mais que la combinaison de plusieurs séparations donne une meilleure couverture protéomique. Le fractionnement le plus traditionnel consiste en la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (E-2D). Mais l'amélioration et la miniaturisation des systèmes de chromatographie en phase liquide à haute performance ainsi que leur couplage direct aux spectromètres de masse ont favorisé ces dernières années le fractionnement des peptides suite à la digestion trypsique. Dans cette approche "shotgun", un mélange ultra complexe de peptides est généré, ce qui a motivé l'application de la chromatographie liquide multidimensionnelle à la protéomique.

La chromatographie liquide (CL) multidimensionnelle confère selon Giddings (1987) une meilleure résolution à la séparation des analytes en augmentant le nombre maximal de pics (la capacité de pics) qu'il est possible d'inscrire dans l'espace de séparation chromatographique. La séparation doit s'effectuer dans des dimensions dites orthogonales, c'est-à-dire selon au moins 2 mécanismes de fractionnement indépendants. Pour cela, il est possible d'associer en série des colonnes de chromatographie de sélectivité différente. En protéomique, plusieurs combinaisons de séparation bidimensionnelle ont été tentées, la seconde dimension consistant le plus souvent en la séparation des peptides par chromatographie liquide en phase inverse (RPLC: Reverse Phase Liquid Chromatography) au fort pouvoir dessalant et directement compatible avec la SM. Ce mode de fractionnement repose sur l'interaction hydrophobe entre les peptides et la phase stationnaire constituée de silice greffée avec des groupements alkyle

de longueur variable, usuellement 18 atomes de carbone. Les peptides sont chargés, dessalés et concentrés sur la colonne lorsque la phase mobile est aqueuse puis élués selon la force des interactions, au fur et à mesure que la concentration du solvant organique augmente. En revanche, plusieurs formes de première dimension ont été utilisées et toutes ne reposent pas sur la CL, ni sur la séparation de peptides. Il s'agit notamment de la chromatographie d'échange de cations SCX (méthode de référence MudPIT), de l'E-1D (méthode GeLC-MS) ou encore de l'isoélectrofocalisation (méthode IEF-OFFGEL).

**L'électrophorèse bidimensionnelle.** L'électrophorèse bidimensionnelle (E-2D) à haute résolution, introduite par O'Farrell en 1975, a longtemps été l'unique méthode d'analyse globale du protéome. L'E-2D permet de fournir une carte protéique où chaque protéine apparaît sous la forme d'une tache ou "spot" suite à la séparation d'un échantillon protéique complexe en 2 dimensions. Tout d'abord, une isoélectrofocalisation (IEF) dans un gel d'acrylamide au sein duquel est ménagé un gradient de pH, permet de séparer les protéines selon leur pI, sous l'effet d'un champ électrique. Ce premier gel est, dans un second temps, apposé à la surface d'un gel de SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) de manière à séparer les protéines selon leur poids moléculaire. L'IEF a longtemps limité la reproductibilité des expériences d'E-2D jusqu'à l'apport par Görg *et al.* (1988) des gradients de pH immobilisés (IPGs), en remplacement des gradients de pH réalisés grâce à des ampholytes. Après coloration des gels, les spots protéiques d'intérêt sont sélectivement prélevés puis analysés par SM après digestion trypsique des protéines directement dans les pièces de gel. La détection des protéines moins abondantes dépend de la méthode de révélation employée. Les colorations à l'argent et fluorescentes opèrent jusqu'à 0,5 ng de protéine/spot (Rabilloud *et al.*, 2010).

L'E-2D est une approche puissante, permettant de séparer plusieurs milliers de protéines sur un gel. Toutefois, elle présente un certain nombre de limites. La technique est laborieuse et difficile à automatiser et à reproduire bien que les gels pré-coulés facilitent la tâche. La détection des protéines avec un pI ou un poids moléculaire extrême est limitée. Celle des protéines hydrophobes est défavorisée malgré l'optimisation des protocoles de solubilisation des protéines à l'aide de détergents compatibles (Chevalier, 2010). En revanche, l'E-2D fractionnant les protéines intactes, demeure une méthode particulièrement attractive pour

différencier les isoformes protéiques ainsi que les protéines modifiées post-traductionnellement.

**La méthode MudPIT.** La méthode MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) proposée par l'équipe de Yates pour le fractionnement de mélanges complexes de peptides digérés en solution avant l'analyse par SM (Link *et al.*, 1999 ; Wolters *et al.*, 2001) se présente comme une méthode de référence. Le mélange acidifié est tout d'abord adsorbé sur une colonne SCX et par augmentation de la force ionique à l'aide d'un gradient salin ou de pH, une fraction d'entre eux est déplacée sur la colonne RP. Chaque fraction élue de la colonne RP est alors analysée par SM.

**La séparation par GeLC-MS.** De plus en plus utilisé, le fractionnement par GeLC-MS combine la séparation des protéines d'un échantillon complexe par SDS-PAGE (E-1D) suivie de la séparation par RPLC des peptides obtenus par digestion dans le gel des différentes bandes protéiques (Blagoev *et al.*, 2004).

Le fractionnement par GeLC-MS était la méthode standard utilisée par l'équipe de Matthias Mann jusqu'à ce que cette dernière propose le fractionnement des peptides par IEF-OFFGEL comme une alternative plus performante pour améliorer la couverture protéomique d'échantillons complexes (Hubner *et al.*, 2008).

**La technologie IEF-OFFGEL.** L'isoélectrofocalisation (IEF) est une technique électrophorétique de haute résolution, utilisée pour séparer et concentrer les biomolécules amphotères à leur point isoélectrique (pI) dans un gradient de pH et sous l'effet d'un champ électrique. La technologie OFFGEL (Figure I-6) a récemment été introduite par Ros *et al.* (2002) pour permettre la purification des protéines en solution. Un format multi-compartimenté permet, à l'issue de la séparation, de récupérer plusieurs fractions de valeurs de pI définies, qui sont ensuite analysées individuellement (Michel *et al.*, 2003). La technologie IEF-OFFGEL s'est révélée particulièrement intéressante en protéomique "shotgun" (Fraterman *et al.*, 2007). Au vu du faible volume d'échantillon par compartiment (150 µL), l'OFFGEL peut être utilisé en pré-fractionnement. La collecte directe de fractions liquides permet le couplage de l'OFFGEL à la CL.

## ***La protéomique quantitative***

**La quantification par électrophorèse bidimensionnelle: la DIGE-2D.** L'E-2D est une méthode puissante de séparation des protéines. Cependant, la grande variabilité inter-gels liée au système, rendant difficile la comparaison des cartes protéiques entre-elles, a limité son utilisation en protéomique quantitative, jusqu'à la mise au point de la technologie DIGE (Difference In Gel Electrophoresis) par Unlü *et al.* en 1997. La DIGE-2D permet de séparer plusieurs échantillons protéiques à comparer sur un même gel 2D. Ceci est rendu possible par le marquage de chacun des échantillons (lysines) à l'aide de fluorophores, les cyanines Cy2, Cy3 et Cy5, de taille et de charge similaires mais de propriétés spectrales distinctes. La DIGE-2D implique l'utilisation d'un échantillon de référence, le standard interne. Constitué par le mélange d'une portion de chaque échantillon de l'expérience, le standard interne, marqué au Cy2, est inclus dans tous les gels 2D de l'expérience, par co-migration avec 2 échantillons respectivement marqués au Cy3 et au Cy5. Le standard interne permet ainsi de comparer entre eux tous les gels de l'expérience. Par gel, 3 images parfaitement superposables sont obtenues grâce à un scanner de fluorescence. L'abondance de chaque spot protéique sur un gel est mesurée relativement à celle du spot correspondant dans le standard interne présent sur le même gel (Marouga *et al.*, 2005). Seule la DIGE-2D permet la quantification relative des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.

**Les principes généraux de la quantification par spectrométrie de masse.** La quantification des peptides par spectrométrie de masse (SM) permet de déduire la quantité des protéines qu'ils composent au sein d'un échantillon biologique. Cette correspondance entre concentration peptidique et concentration protéique dépend de 2 paramètres, l'efficacité de la digestion enzymatique des protéines et la protéotypicité des peptides, un peptide protéotypique étant un peptide généré avec efficacité et caractérisant spécifiquement une protéine unique (Kuster *et al.*, 2005 ; Mallick *et al.*, 2007).

La quantification des peptides repose sur l'interprétation de l'intensité de 2 types de signaux, le signal provenant d'un ion parent sur le spectre SM (signal SM) ou le signal provenant d'un ion fils (fragment) sur le spectre SM/SM (signal SM/SM ou SM<sup>2</sup>), présentant des avantages et inconvénients distincts. En SM simple, plusieurs spectres indépendants sont disponibles et les

signaux SM sont caractérisés par une intensité élevée. Cependant, le bruit de fond en SM peut altérer la précision des signaux de plus faible intensité et dans le cas d'échantillons très complexes, la superposition des ions peut fausser l'analyse du spectre. En SM/SM, le bruit de fond interfère moins mais la faible intensité des ions fils limite le nombre de spectres interprétables et la précision de la mesure (Wilm *et al.*, 2009).

En spectrométrie de masse, l'intensité des signaux n'est pas directement proportionnelle à la concentration des analytes dans l'échantillon, puisque les molécules sont ionisées avant d'être mesurées. Cette discordance provient de la variabilité de l'efficacité d'ionisation d'un peptide à l'autre. L'ionisation des peptides se réalise via un transfert de protons à partir de la matrice acide. Le nombre de protons disponibles est limité, ce qui favorise l'ionisation des peptides de plus haute affinité protonique et de plus haute abondance, entraînant un effet de suppression d'ions (Knochenmuss *et al.*, 2000 ; Karas *et al.*, 2000).

La quantification par spectrométrie de masse consiste en une quantification par marquage isotopique ou en une quantification directe sans marquage, dite "label-free".

La quantification relative par marquage isotopique repose sur l'introduction d'éléments isotopiques de masses différentielles mais de composition chimique équivalente, garantissant pour les peptides comparés une co-élution en nano-CL et une même efficacité d'ionisation (Iliuk *et al.*, 2009). Ainsi, le remplacement d'un atome de  $^1\text{H}$  par un D, d'un  $^{12}\text{C}$  par un  $^{13}\text{C}$  ou d'un  $^{14}\text{N}$  par un  $^{15}\text{N}$  est privilégié (Zhang *et al.*, 2002). L'information quantitative, relative, est obtenue par le rapport des intensités des peptides marqués d'un échantillon et des peptides non marqués d'un autre échantillon ou entre les peptides marqués avec des isotopes différents selon les différents échantillons. L'intérêt est que les échantillons à comparer peuvent ainsi être mélangés (en même quantité) avant fractionnement et analyse par spectrométrie de masse, garantissant la précision et la reproductibilité de la quantification relative (limitant la perte hétérogène de matériel biologique entre les échantillons s'ils étaient traités séparément), d'autant mieux que le mélange a lieu tôt au cours de la préparation des échantillons et rendant possible l'analyse en parallèle de plusieurs échantillons au cours d'une même expérience (ou multiplexage). Les signaux à comparer apparaissent donc sur le même spectre de masse mais sous la forme de plusieurs pics différant par leur masse. Il existe une grande variété de protocoles de marquage isotopique plus ou moins onéreux. Les isotopes peuvent être introduits selon la méthode, au niveau protéique ou peptidique, directement dans les séquences en acides aminés (marquage métabolique, marquage enzymatique) ou par

l'intermédiaire d'étiquettes isotopiques liées par réaction chimique (dans des conditions bien définies) aux protéines/peptides (marquage chimique, Figure I-7).

Les marquages au  $^{15}\text{N}$  et par l'approche SILAC sont 2 types de marquages métaboliques. Le marquage au  $^{18}\text{O}$  est un marquage enzymatique. Les marquages ICPL et ICAT sont 2 types de marquages chimiques avec quantification en SM simple. Les marquages iTRAQ et TMT sont 2 types de marquages chimiques avec quantification en SM/SM à l'aide d'ions rapporteurs. Le comptage de spectres ainsi que l'indice d'abondance protéique (PAI) sont 2 méthodes de quantification sans marquage.

**Le marquage au  $^{15}\text{N}$ .** Le marquage métabolique ou *in vivo* consiste en l'incorporation d'isotopes stables au cours de la synthèse protéique. Les cellules sont cultivées dans un milieu enrichi en isotopes qui s'intègrent dans le protéome durant la prolifération normale des cellules. Un échantillon marqué et un échantillon non marqué peuvent donc être mélangés, digérés, séparés, puis comparés par SM. Ce type de marquage est limité aux cellules métaboliquement actives et ne peut donc pas être appliqué aux tissus prélevés ou aux fluides biologiques (Elliott *et al.*, 2009). Le marquage au  $^{15}\text{N}$  est une méthode de choix pour les organismes autotrophes, tels que les plantes ou bactéries, qui synthétisent leurs propres acides aminés, en modifiant la source d'azote inorganique dans le milieu de croissance de l'un des 2 échantillons à comparer. Le nombre de  $^{15}\text{N}$  incorporés par peptide varie d'un peptide à l'autre, rendant peu prédictible la différence de masse entre les peptides à comparer (Bachi *et al.*, 2008). La précision de la quantification relative des peptides dépend du nombre d'isotopes incorporés. Chez le modèle *Arabidopsis thaliana*, plus de 98% des  $^{14}\text{N}$  sont remplacés par des  $^{15}\text{N}$  (Engelsberger *et al.*, 2006). Le milieu enrichi en  $^{15}\text{N}$  a aussi été utilisé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Kolkman *et al.*, 2006). D'autre part, l'équipe de Yates a réussi ce type de marquage chez le mammifère dans l'ensemble des tissus du rat (Wu *et al.*, 2004 ; McClatchy *et al.*, 2007).

**Le marquage SILAC.** Le marquage SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture), popularisé par l'équipe de Mann en 2002 (Ong *et al.*, 2002), repose sur l'incorporation des  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -lysine et  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -arginine par les protéines néosynthétisées, garantissant le marquage de tous les peptides tryptiques, au niveau d'un seul acide aminé. Ceci permet la comparaison directe entre un peptide marqué et le même peptide non marqué

d'un autre échantillon. Le rapport des intensités des signaux ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ) issus de chaque peptide informe sur le rapport des quantités des protéines correspondantes. Une précaution doit être prise quant à l'arginine capable d'interconversion avec la proline. Un enrichissement du milieu en proline limite cet effet (Bendall *et al.*, 2008). Le marquage SILAC nécessite l'utilisation de sérums dialysés pouvant ralentir la prolifération des cellules suite à la perte de certains facteurs de croissance essentiels (Harsha *et al.*, 2008). De plus, l'efficacité d'incorporation est variable d'un type cellulaire à l'autre, bien meilleure pour les cellules d'organismes hétérotrophes comme les lignées de mammifères (Harsha *et al.*, 2008), qui ont fait l'objet de nombreuses applications. Ainsi, le marquage SILAC a permis entre autre d'étudier la dynamique de voies de signalisation intracellulaires, notamment la voie de l'EGFR (Récepteur à l'Epidermal Growth Factor, Bose *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2010), de reconstituer plus spécifiquement des réseaux d'interaction protéiques après co-précipitation (Dobrevá *et al.*, 2008 ; Boldt *et al.*, 2009), ou de suivre des protéines de façon spatiotemporelle (Milner *et al.*, 2006). De plus, une souris SILAC dont toutes les protéines ont incorporé des isotopes  $^{13}\text{C}$  de lysine a été obtenue sans que la croissance, la reproduction ou le comportement de l'animal ne soient affectés et a fait l'objet d'une publication dans la revue Cell (Krüger *et al.*, 2008).

**Le marquage enzymatique ( $^{18}\text{O}$ ).** L'isotope lourd  $^{18}\text{O}$  est incorporé au cours de la digestion trypsique réalisée en présence de  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , en C-ter des peptides. Ce marquage entraîne une faible variation de masse de 2 (ou 4) Da par rapport au peptide non marqué (Yao *et al.*, 2001), avec un risque de superposition des massifs isotopiques sur le spectre de masse (Iliuk *et al.*, 2009). Dans cette méthode, les 2 échantillons à comparer sont donc digérés séparément, avant leur mélange, contrairement au marquage métabolique, ce qui affecte la précision de la quantification relative. Aussi, le mélange post-digestion d'un échantillon marqué et d'un échantillon non marqué respectivement dans  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  et  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  peut entraîner le remplacement inverse de  $^{18}\text{O}$  par  $^{16}\text{O}$  médié par la trypsine (Gevaert *et al.*, 2008) à moins que celle-ci soit immobilisée lors de la digestion et donc absente après mélange des échantillons (Reynolds *et al.*, 2002).

**Le marquage ICPL.** Le marquage ICPL (Isotope-Coded Protein Label) consiste en la réaction de tous les groupements amine libres des protéines réduites et alkylées de 2 échantillons à comparer avec la forme  $\text{H}_4$  ou  $\text{D}_4$ , de différence de masse 4 Da, du nicotinyln-hydroxysuccinimide (Nic-NHS, Schmidt *et al.*, 2005), avant mélange, fractionnement et

digestion des protéines. Le kit ICPL 4plex permet de comparer quantitativement jusqu'à 4 protéomes à l'aide de différentes formes marquées isotopiquement du Nic-NHS ( $D_4/H_4^{13}C_6/D_4^{13}C_6$ ), variant de 4, 6, et 10 Da par rapport à la forme naturelle ( $H_4$ ). Toutefois, le nombre de marquages par peptide est séquence-dépendant (selon le nombre de lysines), pouvant ainsi compliquer l'analyse.

**Le marquage ICAT.** Le réactif ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) est un des plus anciens réactifs chimiques développés pour la protéomique quantitative (Gygi *et al.*, 1999). A l'origine, les 2 étiquettes ICAT permettant de marquer directement les protéines de 2 échantillons (seulement) à comparer comprenaient un groupement réactif spécifique des thiols (iodoacétamide), une biotine ainsi que  $H_8$  ou  $D_8$ , les différenciant de 8 Da. La biotine permet, après digestion des protéines, la purification sur colonne d'avidine ou de streptavidine des peptides marqués. Une version clivable du réactif, le cICAT, a été proposée (Li *et al.*, 2003 ; Hansen *et al.*, 2003), permettant l'élimination de la biotine en conditions acides après la purification des peptides, ce qui améliore la qualité des spectres SM. D'autre part, dans le réactif cICAT,  $^{12}C_9$  ou  $^{13}C_9$  remplacent  $H_8$  ou  $D_8$ . Cette modification permet de garantir la co-élution des paires de peptides en nano-CL. Tandis que le deutérium raccourcit le temps de rétention des peptides sur la phase inverse par rapport à  $^1H$  (Zhang *et al.*, 2002), le remplacement de  $^{12}C$  par  $^{13}C$  est plus neutre. Le marquage ICAT cible spécifiquement les cystéines, offrant l'avantage à cette méthode de réduire la complexité des échantillons, la cystéine étant un acide aminé relativement rare. Cependant, ceci diminuant la couverture protéique (peu de peptides par protéines sont disponibles), avec 20% des protéines ne possédant pas de cystéine, la quantification par ICAT apparaît moins fiable (Elliott *et al.*, 2009). Cette spécificité a été mise à profit dans plusieurs études portant sur l'effet du stress oxydatif sur le protéome. L'attaque des groupements thiols par les ROS bloquant la réaction de marquage, il a été notamment possible de discriminer les protéines sensibles à l'oxydation (Sethuraman *et al.*, 2004 ; Fu *et al.*, 2008), ou d'étudier les cibles de protéines anti-oxydantes comme la thiorédoxine (Hägglund *et al.*, 2008 ; Fu *et al.*, 2009).

**Le marquage iTRAQ.** Le marquage iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification) des peptides obtenus par digestion tryptique a été décrit pour la première fois par Ross *et al.* (2004). L'étiquette iTRAQ présente une structure tripartite (Figure I-8). Le groupement réactif permet la liaison covalente de l'étiquette aux amines primaires du peptide

présentes en N-ter et sur la chaîne latérale de la lysine (pour les peptides terminés par une lysine en C-ter). Un groupement rapporteur (N-méthyl piperazine) de masse 114, 115, 116, 117 Da (pour le 4plex) ou 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121 Da (pour le 8plex) permet de quantifier différenciellement en parallèle jusqu'à 8 échantillons au cours d'une seule expérience. Cette variation de masse est compensée par un groupement "balance" de manière à ce que la masse globale des 4 ou 8 étiquettes soit identique (respectivement 145 Da et 305 Da), de même que la masse globale d'un même peptide marqué présent dans les 4 (8) échantillons (marquage dit isobarique). Après marquage, les peptides des 4 (8) digestats sont mélangés, fractionnés puis analysés par spectrométrie de masse. En SM, un même peptide présent dans les 4 (8) échantillons initiaux apparaît sous la forme d'un unique pic. La somme des signaux améliore ainsi la sensibilité de détection d'un peptide plus faiblement représenté. En SM/SM, les groupements "balance" sont clivés comme des fragments neutres, libérant ainsi les ions rapporteurs sous la forme de 4 (8) pics séparés d'1 uma sur le spectre SM/SM, qui permettent la quantification relative du peptide par le calcul des rapports de leurs intensités. Le marquage iTRAQ est de plus en plus utilisé aussi bien pour l'étude de lignées cellulaires, de tissus ou de biofluides. De nombreuses applications dans différents domaines en témoignent. Par exemple, dernièrement, cette technologie a été employée pour rechercher des biomarqueurs de rejet de greffe rénale dans le plasma sanguin (Freue *et al.*, 2010), pour étudier la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses (Ji *et al.*, 2010) ou encore pour caractériser les altérations de glycosylation des protéines associées aux maladies (Ueda *et al.*, 2010). L'intérêt du marquage iTRAQ est que, l'ensemble des peptides digérés de chaque protéine étant marqué, il optimise la quantification de chaque protéine à partir des informations obtenues pour plusieurs peptides. Ceci favorise donc l'identification et la quantification des protéines plus faiblement concentrées, faisant du marquage iTRAQ une méthode de choix pour la recherche de biomarqueurs (Elliott *et al.*, 2009). Toutefois, il semble que ce marquage sous-estime les facteurs d'expression (DeSouza *et al.*, 2009).

**Le marquage TMT.** Le marquage TMT (Tandem Mass Tag) des peptides obtenus par digestion trypsique repose sur le même principe que le marquage iTRAQ avec 6 étiquettes à disposition permettant de comparer jusqu'à 6 échantillons en parallèle (Thompson *et al.*, 2003 ; Dayon *et al.*, 2008).

Récemment, une étude (Pichler *et al.*, 2010) a classé les marquages isobariques au regard du taux d'identifications peptidiques, sur un Orbitrap. Le marquage iTRAQ 4plex ressort comme le plus efficace suivi du marquage TMT 6plex puis enfin du marquage iTRAQ 8plex.

Au vu du coût élevé et de la relative lourdeur expérimentale du marquage isotopique, différentes alternatives de quantification sans marquage ont été proposées où les échantillons à comparer sont analysés les uns après les autres dans les mêmes conditions expérimentales pour favoriser la reproductibilité. Toutefois, la normalisation des données nécessite de multiplier les réplicats.

**Le comptage de spectres.** Une des premières méthodes de quantification sans marquage utilisées a été le comptage de spectres acquis pour chaque peptide et donc chaque protéine. Cette technique suppose la proportionnalité entre le nombre de spectres et l'abondance relative de la protéine dans l'échantillon, qui s'avère en fait limitée à 2 ordres de magnitude (Liu *et al.*, 2004). Cette technique permet de comparer l'abondance des protéines au sein d'un échantillon ou entre plusieurs échantillons. La longueur des séquences protéiques, trop ou trop peu importante, peut biaiser ce mode de quantification, particulièrement inadapté pour les protéines faiblement concentrées (Schulze *et al.*, 2010).

**L'indice d'abondance protéique (PAI).** Le PAI (Protein Abundance Index) permet d'estimer approximativement mais simplement la quantité d'une protéine particulière au sein d'un échantillon complexe en calculant le nombre de peptides identifiés rapporté au nombre théorique de peptides tryptiques (Rappsilber *et al.*, 2002). Le PAI a ensuite été remplacé par l'emPAI (exponentially modified Protein Abundance Index), égal à  $10^{\text{PAI}}-1$ , jugé plus fiable (Ishihama *et al.*, 2005).

## ***L'application de la protéomique au développement de biomarqueurs d'intérêt clinique***

La découverte de biomarqueurs par approche protéomique pour le diagnostique et le suivi thérapeutique est un enjeu majeur de la médecine moderne.

**La promesse des biomarqueurs protéiques en clinique.** Un biomarqueur protéique est une protéine dont le niveau d'expression ou les modifications (par clivage ou post-traductionnelles) peuvent être détectés, mesurés et corrélés à un état normal ou pathologique ou à la réponse à un traitement pharmacologique (Boja *et al.*, 2011). Les tissus larguent constamment des protéines ou des fragments protéiques susceptibles de passer dans les fluides biologiques cliniquement accessibles que sont le sang, l'urine ou le liquide céphalo-rachidien. Il s'agit de fragments extracellulaires de protéines transmembranaires éliminées, de protéines intracellulaires perdues suite aux dommages cellulaires ou de protéines sécrétées impliquées dans la communication cellulaire (Anderson and Anderson, 2002). Ainsi l'hypothèse est posée qu'une tumeur ou un tissu en souffrance peut libérer de façon aberrante certaines protéines spécifiques. Ces protéines d'origine tissulaire diluées dans les biofluides pourraient refléter l'état physio-pathologique d'un individu.

Le dosage sanguin de protéines est utilisé en clinique depuis de nombreuses années. A ce jour, 109 tests (Anderson, 2010) basés sur des protéines individuelles non découvertes par la protéomique, comme le CEA (CarcinoEmbryonic Antigen) pour le cancer du colon, le PSA (Prostatic Specific Antigen) pour le cancer de la prostate, le CA 125 (Cancer Antigen 125) pour le cancer de l'ovaire, la cTnI (cardiac Troponine I) pour l'infarctus du myocarde, ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration), l'équivalent américain de l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé). Toutefois, seuls 1 à 2 nouveaux biomarqueurs protéiques par an ont été introduits ces 15 dernières années (Anderson, 2010). Un biomarqueur idéal doit répondre à certains critères, une sensibilité élevée (un faible taux de faux négatifs) et une spécificité élevée (un faible taux de faux positifs), auxquels ne satisfont pas la plupart des biomarqueurs protéiques déjà approuvés (Kulasingham *et al.*, 2010). L'utilisation de panels de biomarqueurs plutôt que de

biomarqueurs uniques apparaîtrait plus fiable et plus propice, nombre de pathologies étant multifactorielles (Visintin *et al.*, 2008).

L'approche protéomique, à grande échelle, offre ainsi la perspective de développer de nouveaux tests cliniques plus sensibles et plus spécifiques. En 2010, la FDA a autorisé OVA1, le premier et unique test diagnostique développé par analyse protéomique, qui aide à identifier les tumeurs malignes de l'ovaire avant chirurgie en s'appuyant sur le dosage sérique combiné de 5 biomarqueurs protéiques (Fung, 2010 ; Zhang and Chan, 2010).

**Les défis liés à la découverte de biomarqueurs dans le plasma sanguin.** Facilement accessible, abondamment disponible, collectable selon une procédure peu invasive et maîtrisée, le sang est le prélèvement biologique privilégié des tests cliniques de routine, ce qui motive la validation de biomarqueurs circulants. Le sang a donc été la première source désignée pour découvrir de nouveaux biomarqueurs par approche protéomique (Liotta *et al.*, 2003). Toutefois, les facteurs pré-analytiques concernant le protocole de prélèvement et de stockage des échantillons avant l'analyse ou la variabilité physiologique inter- et intra-individuelle (sexe, âge, grossesse, régime alimentaire...) doivent être pris en compte (Lambert *et al.*, 2007). Dès 2002, L'HUPO a initié un projet collaboratif entre 35 laboratoires de 13 pays concernant le protéome plasmatique humain (PPP: Plasma Proteome Project). La phase pilote du projet (Omenn *et al.*, 2005) a permis (i) d'encourager le développement de plateformes multi-technologiques, (ii) de recommander l'utilisation du plasma plutôt que du sérum, trop dégradé *ex vivo*, avec l'EDTA (ou le citrate de sodium) comme anticoagulant et (iii) de créer une base de données publique (<http://www.bioinformatics.med.umich.edu/hupo/ppp>) répertoriant 3020 protéines identifiées avec au moins 2 peptides, dont seulement 889 identifiées avec un indice de confiance élevé d'au moins 95% (States *et al.*, 2006).

La communauté scientifique s'est très vite heurtée à un problème majeur: le protéome du plasma sanguin humain est un protéome extraordinairement complexe (Anderson and Anderson, 2002). Le plasma a une teneur de 60-80 mg/mL de protéines. Le rapport de concentrations entre les protéines les moins abondantes et les protéines les plus abondantes atteint un facteur  $10^{12}$  (Figure I-9), soit une dynamique de concentrations  $10^4$  à  $10^6$  fois plus large que dans les cellules et tissus (Corthals *et al.*, 2000 ; Ly and Wasinger, 2011). L'Albumine (Serum albumin), protéine plasmatique majoritaire, est dosée à 35-50 mg/mL tandis que l'Interleukine 6, est dosée à 0-5 pg/mL (Anderson and Anderson, 2002). De plus,

un petit nombre de protéines constitue l'essentiel du contenu protéique total du plasma (Figure I-10). L'Albumine seule en représente plus de la moitié et les 22 protéines les plus abondantes (comme l'Albumine, les Immunoglobulines, le Fibrinogène, la Transferrine, l'Haptoglobine) en constituent 99% (Tirumalai *et al.*, 2003). Or, les biomarqueurs d'intérêt clinique sont présumés se trouver dans la gamme 1-100 ng/mL et en dessous (Qian *et al.*, 2006), à l'instar des biomarqueurs déjà approuvés par la FDA tels le PSA (0,01-100 ng/mL) ou la troponine-T (0,02-100 ng/mL). La recherche de biomarqueurs protéiques dans le plasma sanguin pose donc un défi analytique.

La première démarche a consisté à réaliser le profilage d'échantillons par spectrométrie de masse. La technologie ProteinChip permet l'application d'une goutte de plasma ou de sérum sur une barrette comprenant différentes surfaces chromatographiques (cationique, anionique, hydrophobe, hydrophile) et l'analyse directe et rapide des protéines retenues par spectrométrie de masse SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight), une variante du MALDI-TOF. Les profils protéiques générés pour chacun des patients ("cas"/"contrôle") sont alors comparés et la signature des pics ( $m/z$ ) d'intensité différentielle est proposée comme biomarqueur (Wright, 2002). La méthodologie a été largement appliquée en clinique (Alfred *et al.*, 2004), principalement en cancérologie (Adam *et al.*, 2002 ; Bertucci *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2006) mais aussi en pharmacologie (Pusztai *et al.*, 2004). L'engouement pour cette approche s'est amplifié lorsque Petricoin *et al.* (2002) l'ont présentée comme outil de diagnostic précoce du cancer de l'ovaire, par l'intermédiaire d'une empreinte protéomique discriminante d'apparentes hautes spécificité et sensibilité, sans connaître la nature des protéines impliquées. Toutefois, ces résultats et d'autres se sont avérés difficiles à reproduire, les variations d'expression ayant même parfois été finalement attribuées à des artefacts liés au traitement des échantillons (Baggerly *et al.*, 2004 ; Baggerly *et al.*, 2005 ; Karsan *et al.*, 2005 ; Engwegen *et al.*, 2006). Il est apparu que la plateforme SELDI n'était pas appropriée pour valider les biomarqueurs découverts, qu'un découplage des plateformes de découverte et de validation était nécessaire et que l'indépendance des biomarqueurs vis-à-vis des technologies employées était conditionnée par l'identification des protéines d'intérêt, impossible par SELDI-TOF (Liotta and Petricoin, 2010). Cette approche a tout de même souligné l'intérêt de la spectrométrie de masse en protéomique clinique.

La capacité analytique de la SM étant largement dépassée par l'immense complexité du protéome plasmatique, des techniques de pré-fractionnement dédiées ont été développées. Stratégie la plus commune (Pernemalm *et al.*, 2009), la déplétion par immunoaffinité des

protéines les plus abondantes est réalisée à l'aide d'un mélange d'anticorps spécifiques immobilisés sur une matrice chromatographique (Figure I-11A). Plusieurs kits commerciaux sont disponibles pour retenir jusqu'à 6, 7, 12, 14, 20 protéines majoritaires simultanément. Ce système a été évalué comme particulièrement sélectif et reproductible (Yocum *et al.*, 2005 ; Brand *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2006). Compatible avec une grande variété de fractionnements multidimensionnels protéiques comme la DIGE-2D (Corzett *et al.*, 2006) et peptidiques par chromatographie liquide (Qian *et al.*, 2006), la déplétion s'est révélée efficace pour identifier davantage de protéines et des protéines moins concentrées. Toutefois, des protéines de faible abondance potentiellement intéressantes peuvent être co-déplétées, certaines protéines majoritaires étant des protéines de transport (Merrell *et al.*, 2004). Zhou *et al.* (2004) ont ainsi montré que l'immunodéplétion de l'Albumine entraînait la perte non reproductible de 63 protéines liées.

Plus récemment, une autre stratégie a été proposée comme une alternative à la déplétion (Thulasiraman *et al.*, 2005), utilisant les différences d'affinités de liaison des protéines (Figure I-11B). L'échantillon plasmatique est incubé en présence d'une banque combinatoire d'hexapeptides (6 acides aminés, soit  $20^6=64$  millions de peptides-ligands différents possibles) greffés sur billes. Chaque bille porte des millions de copies d'un unique ligand. Etant donnée l'immense diversité de la banque, l'hypothèse est posée que chaque espèce protéique de l'échantillon complexe ait un ligand privilégié. Tandis que, grâce à un ratio billes/échantillon contrôlé, les protéines majoritaires saturent rapidement leurs peptides-ligands de haute affinité (une grande partie d'entre elles, restée libre, peut donc être éliminée par lavage), la totalité des protéines moins représentées s'adsorbe sans limite sur les billes. Autrement dit, les protéines très abondantes se retrouvent finalement diluées, les protéines de faible abondance sont au contraire concentrées. La technologie d'"égalisation" Equalizer (ProteoMiner) permet ainsi d'atténuer les différences de concentrations protéiques au sein des échantillons plasmatiques à comparer (Righetti *et al.*, 2006 ; Boschetti *et al.*, 2007 ; Righetti *et al.*, 2007 ; Boschetti *et al.*, 2008).

Si les techniques d'immunodéplétion et d'"égalisation" visent à diminuer la dynamique de concentrations du protéome plasmatique, un autre pré-fractionnement consiste en l'enrichissement sélectif d'un sous-protéome, celui des glycoprotéines circulantes. La glycosylation est la MPT qui caractérise la plupart des protéines sécrétées (Spiro, 2002) et les glycoprotéines représentent une part importante du protéome plasmatique (Anderson and Anderson, 2002). Plusieurs méthodes permettent leur purification par affinité (Pernemalm *et*

*al.*, 2009), notamment la glyco-capture des peptides glycosylés de l'échantillon plasmatique digéré sur billes d'hydrazide (Zhang *et al.*, 2003).

Etant donné l'immense complexité du protéome plasmatique et l'incroyable dilution des protéines d'origine tissulaire dans la circulation sanguine, d'autres échantillons biologiques ont été envisagés pour la découverte de biomarqueurs. Ces sources attractives sont les fluides proximaux, dérivés du milieu extracellulaire (Teng *et al.*, 2010), les tissus microdisséqués (Umar *et al.*, 2009 ; Skvortsov *et al.*, 2011), les modèles animaux (Ang *et al.*, 2010 ; Zhou *et al.*, 2010) ou encore les cellules en culture.

**La découverte de biomarqueurs à partir de modèles cellulaires et de milieux de culture conditionnés.** L'utilisation de lignées cellulaires, homogènes, d'histotypes variés, offre un système de découverte de biomarqueurs contrôlé et non biaisé, de par l'élimination des variations génétiques et environnementales inhérentes aux échantillons cliniques (Surinova *et al.*, 2011). Les échantillons cellulaires peuvent être classifiés en groupes à comparer différemment absolument et exclusivement vis-à-vis de la perturbation étudiée qui reproduit *in vitro* un état pathologique. Cette perturbation peut être liée, entre autres, à un traitement médicamenteux (Keenan *et al.*, 2009 ; Di *et al.*, 2010) ou à tout autre facteur appliqué dans le milieu de culture (Deganuto *et al.*, 2010 ; Duan *et al.*, 2010), à l'inactivation ou à la suractivation de l'expression d'un gène (Martin *et al.*, 2009 ; Gomes-Alves *et al.*, 2010) en mettant à profit les techniques de biologie moléculaire et de biologie cellulaire.

Un nouveau champ d'investigation a explosé ces dernières années, l'analyse protéomique des surnageants de culture dans lesquels sont libérées les protéines sécrétées par les cellules, avec l'hypothèse de les retrouver ensuite dans la circulation sanguine comme biomarqueurs (Dowling and Clynes, 2011).

Se distinguent 3 grandes voies de sécrétion dirigeant les protéines vers la surface cellulaire ou l'espace extracellulaire (Nickel and Rabouille, 2009, Figure I-12). La voie classique, dépendante du reticulum endoplasmique/Golgi, est empruntée par la plupart des protéines possédant en N-ter un peptide signal qui les adresse au reticulum endoplasmique (RE). Les protéines sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi dans des vésicules recouvertes de COPII (coat protein complex II). Deux voies dites non classiques, dont les mécanismes

moléculaires ne sont pas encore élucidés, ont été découvertes. La première concerne certaines protéines possédant un peptide signal, telles CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, Yoo *et al.*, 2002) ou CD45 (Baldwin and Ostergaard, 2002), qui traversent le RE mais atteignent la membrane cellulaire sans passer par les vésicules recouvertes de COPII et/ou l'appareil de Golgi. La seconde voie non classique, indépendante du RE/Golgi, est utilisée par des protéines dépourvues de peptide signal, cytoplasmiques ou nucléaires, dont les fonctions intracellulaires sont bien caractérisées mais qui, sous l'effet d'un stress, peuvent être relarguées pour médier des fonctions extracellulaires différentes (Nickel and Seedorf, 2008). Il s'agit, par exemple, de la Thiorédoxine, protéine cytoplasmique impliquée dans la balance redox. Sécrétée, la Thiorédoxine peut réguler certains canaux ioniques impliqués dans la perception de la douleur ou la thermosensation (Flockerzi, 2007 ; Venkatachalam and Montell, 2007). Aussi, HMGB-1 (High-Mobility Group Box 1), protéine nucléaire se liant à la chromatine pour réguler l'expression des gènes, exerce un rôle extracellulaire de cytokine pro-inflammatoire (Scaffidi *et al.*, 2002).

Le sécrétome, dont le terme a été proposé par Tjalsma *et al.* (2000), qualifie la composition des espèces protéiques sécrétées à un instant donné dans un environnement particulier (Chenau *et al.*, 2008). Certains facteurs en limitent l'analyse. En effet, les protéines sécrétées se retrouvent extrêmement diluées dans un grand volume de surnageant de culture. De plus, le sérum animal généralement ajouté au milieu de culture pour fournir les facteurs de croissance nécessaires augmente largement la dynamique de concentrations protéiques au sein du surnageant. Enfin, un taux basal non négligeable et non spécifique de protéines intracellulaires contamine le surnageant, conséquence de la mort normale des cellules. Ce taux est accentué en cas de traitement des cellules par un agent cytotoxique. Aussi face à cet effet de dilution du sécrétome, des précautions particulières doivent être prises quant à l'analyse protéomique d'un surnageant de culture. Les cellules sont ainsi typiquement cultivées dans un milieu de culture sans sérum, dit conditionné (Kulasingam and Diamandis, 2008). L'absence de sérum perturbant la croissance cellulaire, les conditions de culture dans ce nouveau milieu doivent être optimisées, notamment la densité d'ensemencement, la durée d'incubation, le volume de milieu, le type de flacons de culture. Des tests de viabilité cellulaire basés sur le dosage dans le surnageant de culture d'une protéine caractéristique du compartiment intracellulaire, comme la Lactate déshydrogénase ou l'Adénylate kinase, permettent d'évaluer la contamination du milieu conditionné par des protéines intracellulaires (Higa *et al.*, 2008). Avant l'analyse protéomique, il est aussi nécessaire de concentrer le

milieu conditionné afin d'enrichir l'échantillon en protéines sécrétées (Makridakis and Vlahou, 2010).

Cette approche intéresse beaucoup l'oncologie, le sécrétome des lignées cellulaires ayant été défini comme un formidable "réservoir de biomarqueurs" du cancer (Xue *et al.*, 2008 ; Pavlou and Diamandis, 2010). Chenau *et al.* (2009) ont démontré par OFFGEL-CL SM/SM que des protéines sécrétées *in vitro* par des cellules tumorales pulmonaires pouvaient être détectées et dosées *in vivo* dans le plasma sanguin d'un modèle animal. Dernièrement, Wu *et al.* (2010) ont analysé par GeLC-MS les milieux conditionnés de 23 lignées cellulaires humaines dérivées de 11 types cancéreux afin de découvrir d'une part, des biomarqueurs spécifiques d'un type de cancer et d'autre part, des biomarqueurs généraux du cancer.

Plusieurs projets pharmacoprotéomiques ont utilisé l'analyse du sécrétome comme stratégie pour découvrir de nouveaux biomarqueurs d'intérêt pharmacologique. Ainsi, Lewis *et al.* (2010) ont développé un modèle cellulaire d'étude de la toxicité hépatique. McClelland and Gullick (2007) ont recherché par E-2D de potentiels biomarqueurs de l'activité du Gefitinib (Iressa), un inhibiteur de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), dans le milieu conditionné de 2 lignées cellulaires dont la croissance est EGFR-dépendante.

Ces dernières années, la protéomique a permis la découverte d'une pléthore de biomarqueurs potentiels avec des applications cliniques très variées. Polanski and Anderson (2006) ont ainsi compilé à partir de la littérature 1261 protéines susceptibles d'être différentiellement exprimées dans le cancer chez l'Homme.

Cependant, le constat s'impose du très faible taux de validation pré-clinique des biomarqueurs découverts. Il apparaît que le développement d'un biomarqueur, de sa découverte à sa validation est un processus laborieux.

**De la découverte à la validation d'un biomarqueur.** Le processus de développement d'un biomarqueur implique, après la phase de découverte, une phase de validation pré-clinique sur un très grand nombre d'échantillons plasmatiques (Rifai *et al.*, 2006). La phase de découverte repose sur une approche à grande échelle, sans *a priori*, menée sur une plateforme protéomique centrée sur la spectrométrie de masse. La validation, quant à elle, est réalisée par une méthode de quantification ciblée très sensible (limite de détection des protéines < ng/mL de plasma) utilisant des anticorps spécifiques, l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent

Assay), format standard en routine clinique. Si l'ELISA est adapté pour valider un unique analyte à partir d'un grand nombre d'échantillons, il l'est moins pour tester un grand nombre d'analytes. En effet, il n'existe à ce jour de tests commerciaux que pour un nombre limité de protéines et la mise au point *de novo* de tels tests est longue et très coûteuse. Ainsi, bien que la phase de découverte puisse révéler des centaines de protéines potentiellement intéressantes, la sélection des protéines à valider se trouve fréquemment biaisée au profit des seules protéines testables (Paulovich *et al.*, 2008). La configuration découverte/validation (Figure I-13) bridant le processus de développement d'un biomarqueur, un autre schéma en 3 phases, découverte/vérification/validation (Figure I-14), a été proposé par le CPTC (Clinical Proteomic Technologies for Cancer) à l'Institut National du Cancer américain (National Cancer Institute, NCI), où une étape de vérification met à profit la spectrométrie de masse pour faire le pont entre la découverte et la validation (Boja *et al.*, 2010).

Durant la phase de découverte, une analyse protéomique différentielle comparant 2 états, normal et perturbé, est menée afin d'identifier les centaines de protéines affectées (sur-exprimées, modifiées par MPT) qui se présentent comme autant de "candidats biomarqueurs" de la pathologie étudiée. A ce stade, le taux de faux positifs est élevé, en particulier pour les protéines de faible abondance, donc d'intérêt. En effet, la faible fréquence de sélection de leurs peptides digérés pour le séquençage par SM/SM, associée à la faible intensité des signaux générés, est souvent à l'origine de différences artificielles (Rifai *et al.*, 2006). L'analyse est effectuée à partir d'un petit nombre d'échantillons, préférentiellement de liquides proximaux, de tissus représentatifs ou de systèmes cellulaires ou animaux modèles, offrant une plus large perspective de biomarqueurs potentiels que le plasma sanguin. Au terme de cette phase de découverte, les candidats les plus prometteurs sont prioritairement sélectionnés pour la phase de vérification selon que les protéines (i) sont sécrétées, (ii) ont déjà été détectées dans le plasma, (iii) ne sont pas d'origine hépatique (contrairement à la majorité des protéines classiques du plasma, Zhang *et al.*, 2011), (iv) sont tissu-spécifiques et (v) sont liées aux voies biologiques impliquées dans le processus pathologique (Surinova *et al.*, 2011).

Au cours de la phase de vérification, les centaines de candidats biomarqueurs pré-sélectionnés sont évalués directement dans le plasma sanguin d'une petite cohorte représentative de la population ciblée, de patients (< 100) classifiés selon les données cliniques en 2 groupes, "cas" et "contrôle". Le choix précautionneux des patients et la collection standardisée des échantillons plasmatiques doivent minimiser l'introduction de variations parasites. Sont dits

"vérifiés" les candidats dont l'expression différentielle est confirmée (Surinova *et al.*, 2011). L'intégration au processus de développement d'un biomarqueur de la phase de vérification a été motivée par l'essor de méthodes protéomiques permettant la quantification absolue ciblée des protéines par spectrométrie de masse. Le mode MRM(SRM)/SID-MS (Multiple(Selected) Reaction Monitoring/Stable Isotope Dilution-Mass Spectrometry) permet, à l'aide d'un triple quadrupôle (QQQ), de quantifier un peptide protéotypique particulier dans un digestat peptidique complexe auquel a été ajoutée une quantité connue du même peptide synthétique marqué isotopiquement qui sert de standard interne (Kuhn *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2010, (Figure I-15). Dans un peptide AQUA (Absolute QUAntification), les isotopes sont directement introduits au cours de la synthèse peptidique (Brun *et al.*, 2009) mais les isotopes peuvent aussi être introduits par l'intermédiaire d'étiquettes isotopiques mTRAQ (MRM Tags for Relative and Absolute Quantification), variation du réactif iTRAQ (DeSouza *et al.*, 2008 ; DeSouza *et al.*, 2009). La stratégie PSAQ (Protein Standard Absolute Quantification) présente l'avantage d'introduire un standard protéique marqué dans l'échantillon avant la digestion enzymatique (Brun *et al.*, 2009). L'application directe de l'approche MRM(SRM)/SID-MS à la quantification des protéines dans le plasma brut ne permet de couvrir qu'une dynamique de concentrations d'un facteur  $10^4$ - $10^5$  correspondant aux protéines d'abondance élevée ou moyenne, avec une limite de détection de 0,5-1  $\mu\text{g/mL}$  de plasma (Anderson and Hunter, 2006 ; Addona *et al.*, 2009). Aussi, de nombreuses études se sont consacrées à améliorer cette sensibilité en fractionnant les échantillons plasmatiques par chromatographie liquide multidimensionnelle et/ou par immunodéplétion des protéines les plus abondantes (Kuhn *et al.*, 2004 ; Keshishian *et al.*, 2007). La méthode SISCAPA-MRM(SRM) (Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies), introduite par Anderson *et al.* (2004), repose sur l'utilisation d'un anticorps anti-peptide spécifique pour capturer le peptide protéotypique cible dans l'échantillon plasmatique digéré, permettant ainsi son enrichissement sélectif, préalablement à l'analyse par MRM(SRM)/SID-MS. La troponine I, biomarqueur établi d'atteinte cardiaque a ainsi pu être dosée (Kuhn *et al.*, 2009). Cette méthode s'est révélée reproductible pour la quantification dite "multiplexée" de plusieurs peptides d'intérêt dans un même échantillon, offrant ainsi une perspective d'analyse à haut-débit (Kuhn *et al.*, 2009 ; Whiteaker *et al.*, 2010). Des protéines aussi peu concentrées (ng- $\mu\text{g/mL}$  de plasma) que la Tumor protein D52, l'Ostéopontine, la Caluménine ou la Disulfide isomerase A4 ayant pu être détectées, l'approche SISCAPA améliore la sensibilité de la méthode MRM(SRM) de l'ordre de 10 à 1000 fois (Figure I-16). L'augmentation du volume de plasma testé de 10  $\mu\text{L}$  à 1 mL permettrait même d'atteindre les protéines de la gamme du pg au ng/mL (Whiteaker *et*

*al.*, 2010). L'étape limitante du développement d'un test SISCAPA-MRM(SRM) est la production d'un anticorps anti-peptide. Toutefois, un anticorps unique par peptide est requis tandis que l'ELISA sandwich classique nécessite 2 anticorps actifs dans les mêmes conditions et qui n'interfèrent pas. De plus, le standard interne utilisé est une protéine recombinante purifiée dans la méthode ELISA mais un peptide facilement généré par synthèse chimique dans la méthode SISCAPA-MRM(SRM). Le développement d'un test SISCAPA-MRM(SRM) est donc moins long et moins coûteux que celui d'un test ELISA (Whiteaker *et al.*, 2010). Une autre méthode d'enrichissement sélectif repose sur l'observation que les protéines sécrétées sont glycosylées (Spiro, 2002). Elle allie la glyco-capture sur billes d'hydrazide des glycoprotéines plasmatiques et l'analyse par MRM(SRM)/SID-MS des peptides glycosylés sélectivement élués après clivage par une glycosidase (Stahl-Zeng *et al.*, 2007).

Les quelques candidats biomarqueurs qui ont passé la phase de vérification sont alors soumis à validation. Pendant cette dernière phase pré-clinique, la performance des candidats est jugée en termes de sensibilité (probabilité qu'un échantillon "cas" soit testé positif), de spécificité (probabilité qu'un échantillon "contrôle" soit testé négatif), de précision, en testant des centaines d'échantillons plasmatiques de patients désignés rétrospectivement (Surinova *et al.*, 2011). L'approche MRM(SRM)/SID-MS n'étant toujours pas autorisée par la FDA, un test ELISA est généralement développé pour chacun des candidats restants. Un immuno-test alternatif capable de "multiplexage" basé sur la cytométrie de flux, la plateforme Luminex, est à l'étude (Kim *et al.*, 2009). Une fois validé, le panel de biomarqueurs, généralement protégé par un brevet, entre enfin en phase d'évaluation clinique.

Le développement d'un biomarqueur (d'un panel) est un projet collaboratif, associant chercheurs, médecins, statisticiens. De la découverte initiale et de l'évaluation pré-clinique dans le plasma jusqu'à la mise en place d'un test diagnostique approuvé, le processus multi-phases apparaît, par l'absence de standardisation, comme "un parcours vers l'utilité clinique [onéreux], long et incertain" (Rifai *et al.*, 2006). La chaîne instrumentale pré-clinique employée doit permettre le passage d'une approche protéomique à grande échelle à une analyse quantitative ciblée, capable de vérifier à haut débit des protéines plasmatiques de concentration de l'ordre du ng/mL. L'essor de méthodologies basées sur la spectrométrie de masse en mode MRM(SRM)/SID-MS pour accélérer le processus est très prometteur.

## Contexte et objet de l'étude

L'oxaliplatine est un sel de platine de troisième génération, après le cisplatine et le carboplatine, utilisé en chimiothérapie humaine anticancéreuse. Ces dernières années, la molécule cytotoxique a transformé la prise en charge des patients ayant un cancer colorectal métastatique. L'oxaliplatine ne présente pas de résistance croisée avec le cisplatine et possède un meilleur profil de tolérance. Aussi de nombreux essais sont en cours afin d'évaluer la pertinence clinique de son utilisation dans d'autres localisations tumorales en remplacement du cisplatine. Toutefois, l'oxaliplatine occasionne une toxicité d'ordre neurologique handicapant fortement les patients dans leur vie quotidienne, si bien que la chimiothérapie, pourtant efficace, est régulièrement retardée ou suspendue.

Cette neurotoxicité limitante se manifeste par une neuropathie périphérique originale avec 2 composantes, aiguë et chronique. Depuis plusieurs années, notre équipe s'efforce de caractériser et prévenir la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Le mécanisme soulignant la neuropathie aiguë a ainsi été élucidé en lien avec la structure même de la molécule. L'oxalate libéré au cours de l'hydrolyse du médicament entraîne le blocage des canaux sodium voltage-dépendant via l'altération de l'homéostasie calcique. Notre équipe a aussi démontré l'efficacité en prophylaxie des perfusions de Ca/Mg. La neuropathie chronique quant à elle demeure problématique. Diverses options de neuroprotection ont été envisagées sans réel succès. Certains patients étant plus prédisposés que d'autres à développer une neurotoxicité, un (des) biomarqueur prédictif pourrait permettre de dépister les patients à risque et d'optimiser l'utilisation de l'oxaliplatine dans le cadre d'une médecine personnalisée. Devant la variabilité interindividuelle du phénomène, une approche pharmacogénétique a été envisagée. Habituellement, les polymorphismes sont recherchés dans les gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments mais l'oxaliplatine est activé par hydrolyse non enzymatique. Notre équipe s'est en revanche intéressée à la voie de l'oxalate et d'autres polymorphismes fonctionnels ont été recherchés au niveau de gènes ciblés codant pour des canaux ioniques ou encore des enzymes de détoxification. Cependant à l'heure actuelle, aucun biomarqueur ne permet l'individualisation de la prescription d'oxaliplatine.

Dans ce cadre, nous nous sommes proposés de poursuivre ce travail de caractérisation et de prévention de la neurotoxicité de l'oxaliplatine, en appréhendant le problème de manière globale et innovante, par approche protéomique.

Dans un premier temps, notre tâche a été méthodologique. Nous avons développé au laboratoire 2 approches robustes et reproductibles permettant l'analyse protéomique quantitative différentielle de mélanges protéiques très complexes et de sources biologiques variées. Une approche "top-down" par DIGE-2D a été mise en place, afin de séparer par électrophorèse bidimensionnelle les protéines intactes préalablement marquées à l'aide de fluorochromes. Une approche "bottom-up" par CL-SM/SM, permettant l'analyse de mélanges peptidiques issus de la digestion trypsique en solution d'échantillons protéiques, a aussi été envisagée et couplée à la technologie iTRAQ de quantification par SM. Un nouveau système de fractionnement des peptides par isoélectrofocalisation, l'OFFGEL, compatible avec le marquage iTRAQ des peptides venant d'être proposé, nous avons testé la capacité du protocole expérimental iTRAQ-OFFGEL-RPLC-SM/SM à améliorer la couverture protéomique.

Nous avons alors appliqué ces 2 approches protéomiques quantitatives à l'étude des mécanismes de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Un modèle cellulaire a été utilisé. La bien définie lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y (Ross *et al.*, 1983) est un système d'étude *in vitro* de la toxicité neuronale permettant l'évaluation des dommages au système nerveux central ou périphérique. Les études concernent aussi bien l'effet de polluants environnementaux (les dioxines, Jung *et al.*, 2009 ; les métaux lourds, Chen *et al.*, 2008 ; les pesticides, Carlson *et al.*, 2008) et de molécules chimiques (l'acrylamide, Sumizawa *et al.*, 2009 ; le NMDA (N-Methyl-D-Aspartate), Corasaniti *et al.*, 2007) que le criblage de molécules à visée neuroprotectrice (Porcal *et al.*, 2008), les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Hung *et al.*, 2009 ; Parkinson, Bayir *et al.*, 2009) ou la neurotoxicité des médicaments. En particulier, la lignée SH-SY5Y est un modèle de neurotoxicité des médicaments anticancéreux tels les taxanes (le paclitaxel, Scuteri *et al.*, 2006) et les dérivés du platine (le cisplatine et l'oxaliplatine, Donzelli *et al.*, 2004). Les cellules SH-SY5Y sont des cellules de type neuronal immatures et proliférantes. Toutefois, les sels de platine induisant l'apoptose des neurones post-mitotiques de ganglions de racine dorsal via leur ré-entrée dans le cycle cellulaire (Gill *et al.*, 1998), Donzelli *et al.* (2004) ont proposé la lignée comme modèle d'étude de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Nous avons traité ou non les cellules pendant 24 h, la neuropathie apparaissant précocément chez les patients, par 5  $\mu$ M

d'oxaliplatine, dose correspondant à la concentration maximale moyenne du médicament dans le plasma des patients après 2 h de perfusion à 85 mg/m<sup>2</sup> (Graham *et al.*, 2000), ou par 2 fois (10 µM) ou 10 fois cette dose (50 µM). Les extraits protéiques totaux ont été comparés à la fois par DIGE-2D et par iTRAQ-OFFGEL-RPLC-SM/SM afin de révéler les protéines dont le niveau d'expression est altéré par l'oxaliplatine et de dégager les voies biologiques régulées par le traitement.

Afin de découvrir des biomarqueurs protéiques circulants de la neurotoxicité de l'oxaliplatine, nous avons aussi appliqué l'approche iTRAQ-OFFGEL-RPLC-SM/SM au plasma sanguin. Une nouvelle stratégie de pré-fractionnement visant à diminuer la dynamique de concentrations du protéome plasmatique, l'Equalizer (ProteoMiner), venant d'être développée, nous avons entrepris de la comparer à la technique commune d'immuno-déplétion. L'impact de notre fractionnement peptidique multidimensionnel et du marquage iTRAQ sur le nombre total de protéines plasmatiques identifiées et sur la détection de protéines plus faiblement concentrées s'est avéré limité. Nous avons donc réorienté notre démarche et opté pour une source de biomarqueurs moins complexe en retournant vers notre modèle cellulaire de neurotoxicité. L'analyse protéomique des milieux de culture conditionnés dans lesquels ont été libérées pendant 72 h les protéines sécrétées par les cellules traitées ou non par l'oxaliplatine a été réalisée par l'approche iTRAQ-OFFGEL-RPLC-SM/SM, dans le but d'identifier des candidats biomarqueurs de la neurotoxicité de l'oxaliplatine, avec l'espoir de les retrouver ensuite dans la circulation sanguine.

## **MATERIELS ET METHODES**

## Culture cellulaire et extraction des protéines

**Culture des cellules SH-SY5Y.** La lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y a été obtenue de l'ATCC (CRL-2266), amplifiée puis congelée en plusieurs ampoules dans l'azote liquide. En routine, les cellules étaient maintenues en milieu DMEM (4,5 g/L de glucose, Lonza, Basel, Suisse) sans antibiotiques mais supplémenté de 15% (v/v) de sérum de veau fœtal (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Autriche) et 2 mM de L-glutamine (Lonza), à 37°C dans une atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub> (Encinas *et al.*, 2000). Les cellules étaient régulièrement entretenues, passées avant d'atteindre la confluence, jamais trop diluées (au 1/4 ou au 1/5 maximum) et contrôlées pour l'absence de contamination par les mycoplasmes à l'aide du kit MycoAlert (Lonza).

**Test de la viabilité cellulaire.** La viabilité des cellules SH-SY5Y a été estimée par test MTT. Les cellules ont été mises en culture en plaque 96 puits. Le lendemain, elles ont été traitées par différentes dilutions d'oxaliplatine (Eloxatin<sup>®</sup>, 5 mg/mL dans l'eau, Sanofi Aventis) préparées en cascade (au 1/2) dans le milieu de culture à partir de 200 µM. Après 24 h d'incubation, le méthylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Corporation, Saint-Louis, MO, USA) a été ajouté dans chaque puits à la concentration finale de 0,5 mg/mL. Les cellules ont été incubées en présence du MTT pendant 5h à 37°C. Le milieu a alors été aspiré puis les cristaux de formazan formés ont été dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich Corporation) ajouté à chaque puits. Les puits ont été lus à 570 nm. La valeur d'absorbance obtenue pour la dose 0 µM (CTRL) correspondant à une viabilité cellulaire de 100%, la viabilité des cellules a pu être proportionnellement estimée pour chaque dose d'oxaliplatine. Les tests MTT ont été effectués sur 3 cultures cellulaires indépendantes.

**Préparation des extraits cellulaires.** Après que les cellules ont été traitées par 0 µM, 5 µM, 10 µM ou 50 µM d'oxaliplatine pendant 24 h, le milieu contenant les cellules flottantes a été collecté puis les cellules adhérentes ont été décollées en utilisant un tampon sans enzyme (Cell Dissociation Buffer, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) et combinées aux cellules flottantes. Les cellules ont alors été lavées à 3 reprises par centrifugation avec du PBS à température ambiante. Les culots cellulaires ont été lysés dans une solution composée de 7 M d'urée, 2 M de thiourée et 4% (w/v) de CHAPS. La lyse s'est achevée par brève sonication dans la glace puis clarification par centrifugation. Pour chacun des 4 réplicats biologiques, les extraits protéiques totaux ont été partagés en 2 fractions, chacune réservée à l'une des 2

expérimentations DIGE-2D ou iTRAQ. Les lysats ont ensuite été dessalés et changés de tampon par précipitation à l'aide du kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Allemagne), s'ils étaient destinés à la DIGE-2D, ou par précipitation toute la nuit à l'acétone 100% froid, s'ils étaient destinés à être plus tard marqués à l'iTRAQ. S'ils n'étaient pas utilisés, les échantillons étaient alors conservés à -80°C. Le contenu en protéines a été déterminé à l'aide du kit FluoroProfile (Sigma-Aldrich Corporation), avec la BSA comme standard.

**Différenciation des cellules SH-SY5Y.** Les cellules SH-SY5Y ont été différenciées en suivant le protocole séquentiel, en 2 étapes, décrit par Encinas *et al.* (2000). Les cellules ont étéensemencées en milieu complet (avec 15% de sérum) à une densité de  $10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des flacons de culture Nunc de 75 cm<sup>2</sup> (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France), non recouverts de collagène. L'acide all-*trans*-rétinoïque (AR, Sigma-Aldrich Corporation) a été ajouté le lendemain au milieu complet à la concentration finale de 10 µM. Après 5 j en présence d'AR, les cellules ont alors été lavées 4 fois avec du milieu DMEM sans sérum. Ensuite, du milieu DMEM sans sérum avec 2 mM de L-glutamine et 50 ng/mL de la neurotrophine Brain-derived neurotrophic factor (BDNF, Alomone Labs, Jérusalem, Israël) a été déposé à la surface des cellules (8 mL/75 cm<sup>2</sup>), renouvelé au bout de 3 j de culture puis laissé encore pendant 4 j.

**Préparation des milieux conditionnés.** Au bout des 7 j de différenciation en présence de BDNF, le milieu a été éliminé et remplacé par du milieu DMEM sans sérum avec 2 mM de L-glutamine, 50 ng/mL de BDNF et 0 µM, 1 µM ou 10 µM d'oxaliplatine pendant 72 h. Les surnageants ont alors été collectés, centrifugés pour éliminer les cellules flottantes, filtrés (0,22 µm) puis conservés à -80°C. Les milieux conditionnés provenant de 2 réplicats biologiques ont été concentrés par centrifugations répétées à 14°C dans des concentrateurs Vivaspin Hydrosart (2000 MWCO, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Allemagne). Les sécrétomes ont ainsi été repris dans 0,5 M de triéthylammonium bicarbonate (TEAB), pH 8,5 (Sigma-Aldrich Corporation) puis conservés à -80°C. Le contenu en protéines a été déterminé à l'aide du kit FluoroProfile (Sigma-Aldrich Corporation), avec la BSA comme standard.

**Dosage de l'adénylate kinase.** La cytotoxicité de l'oxaliplatine vis-à-vis des cellules SH-SY5Y après 72 h de traitement a été évaluée par le dosage de l'adénylate kinase (AK), protéine cytoplasmique, dans le milieu extracellulaire en utilisant le kit ToxiLight (Lonza), selon le protocole du fournisseur. La valeur de luminescence obtenue pour l'AK totale, dosée

après la lyse complète dans le milieu des cellules à l'aide du réactif ToxiLight 100% Lysis Reagent (Lonza), représente 100% de cytotoxicité. Les dosages de l'AK ont été effectués sur 3 cultures cellulaires indépendantes.

**Culture des cellules SH-SY5Y en milieu N2.** Les cellules SH-SY5Y ont étéensemencées en milieu DMEM enrichi de 2 mM de L-glutamine (Lonza), sans sérum mais avec 1% (v/v) du supplément neurobiologique N2 (Invitrogen Corporation), recommandé pour la culture sélective des neurones post-mitotiques et lignées cellulaires de phénotype neuronal. Les cellules ont été traitées par 0  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M d'oxaliplatine pendant 72 h. Les surnageants ont alors été collectés, centrifugés pour éliminer les cellules flottantes, filtrés (0,22  $\mu$ m), concentrés par centrifugations répétées à 14°C dans des concentrateurs Vivaspin Hydrosart (2000 MWCO, Sartorius Stedim Biotech) puis conservés à -80°C. Le contenu en protéines a été déterminé à l'aide du kit FluoroProfile (Sigma-Aldrich Corporation), avec la BSA comme standard.

## **Préparation des ganglions de racine dorsale de rat**

Des rats (300-450 g) Sprague-Dawley (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) ont été utilisés. Les animaux ont été maintenus en conditions standards (température ambiante de 22°C, cycles lumière/obscurité de 12 h/12 h) avec un accès illimité à la nourriture et à l'eau. Une habitude d'une semaine à l'environnement et aux manipulations d'entretien a été permise. Lors du traitement ou du prélèvement, les rats ont été anesthésiés au gaz fluothane (2,5 à 3 % dans l'O<sub>2</sub>) selon une procédure conduite dans le respect des règles éthiques (86/609/EEC). Pour le traitement, la veine jugulaire a été isolée et canulée au niveau du cou et les rats ont reçu pendant 30 min une solution glucosée (5%) de 1 mL d'oxaliplatine à raison de 85 mg/m<sup>2</sup> ou une solution de glucose (5%). Après injection intraveineuse, la veine a été définitivement clampée et l'incision suturée après application d'un antibiotique et de xylocaïne pour éviter une douleur de la région opérée. Pour les 2 groupes de rats ayant reçu une unique injection, le prélèvement des ganglions de racine dorsale a été réalisé 2 h ou 24 h après le traitement. Pour le groupe de rats ayant reçu 2 traitements d'oxaliplatine à 1 semaine d'intervalle, le prélèvement des ganglions a été réalisé 24 h après le second traitement. La seconde injection a été pratiquée comme la première en utilisant la jugulaire controlatérale. Dans tous les cas, le comportement des rats a été surveillé pour s'assurer que le clampage de la ou des jugulaires n'avait pas d'effets. L'absence de symptômes était jugée comme la preuve que la circulation

parallèle permettait de suppléer la circulation dans la jugulaire. Pour chaque rat, 4 à 6 ganglions de racine dorsale ont été prélevés sous anesthésie, lavés 3 fois dans du PBS froid puis congelés à -80°C. Les échantillons ont été lysés par sonication sur glace en tampon RIPA, clarifiés par centrifugation puis conservés à -80°C. Le contenu en protéines a été déterminé à l'aide du kit FluoroProfile (Sigma-Aldrich Corporation), avec la BSA comme standard.

## **Réduction de la complexité du protéome plasmatique**

**Echantillons de plasma sanguin humain.** Un mélange de plasmas citratés, viro-inactivés par photo-oxydation au Bleu de Méthylène, obtenus de 10 donneurs sains par aphérèse, a été fourni par l'Etablissement Français du Sang de Bourgogne Franche Comté (CHU Le Bocage, Dijon, France). Le mélange de plasma a été conditionné en paillettes de 0,5 mL conservées à 4°C pendant 2 h avant leur transfert en azote liquide. Les paillettes ont été soigneusement emballées dans un bac contenant de la carboglace durant leur transport jusqu'à notre laboratoire puis ont été placées à -80°C dès leur réception.

**Déplétion des protéines plasmatiques de haute abondance par immunoaffinité.** Les 14 protéines plasmatiques les plus abondantes ont été éliminées du plasma selon une méthode de déplétion reposant sur l'utilisation d'anticorps spécifiques à l'aide du système MARS-Hu 14 (Human 14 Multiple Affinity Removal System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Deux cartouches différentes ont été utilisées pour dépler 10 x 10 µL de plasma préalablement filtré (0,22 µm). Ont été réalisées 4 expériences de déplétion indépendantes (soit 2 par cartouche). Le procédé a nécessité 2 tampons, A et B (Agilent Technologies). Le tampon A, tampon phosphate salin de pH 7,4, a été utilisé lors des étapes d'équilibration, de dépôt de l'échantillon et de lavages. Les fractions non retenues contenant les protéines d'intérêt, soit de faible abondance, ont été collectées, concentrées par centrifugations répétées à 14°C dans des concentrateurs Vivaspin Hydrosart (2000 MWCO, Sartorius Stedim Biotech), reprises dans 0,5 M de triéthylammonium bicarbonate (TEAB), pH 8,5 (Sigma-Aldrich Corporation) puis conservées à -80°C jusqu'à leur analyse. Le contenu en protéines a été déterminé à l'aide du kit FluoroProfile (Sigma-Aldrich Corporation), avec la BSA comme standard. Le tampon B contenant de l'urée, de pH 2,5 a été utilisé pour l'élution des protéines

abondantes avant la régénération des colonnes. Les expériences de déplétion ont été menées à température ambiante, selon les recommandations du fournisseur.

**Traitement du plasma par une banque combinatoire d'hexapeptides.** Les concentrations des protéines plasmatiques ont été "égalisées" à l'aide du kit d'enrichissement ProteoMiner (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) reposant sur l'utilisation de billes greffées d'une banque combinatoire d'hexapeptides (ligands). Ont été menées en parallèle 4 expériences indépendantes, à l'aide de 4 colonnes différentes, en suivant les instructions données par le constructeur. Chaque colonne a été chargée avec 900  $\mu\text{L}$  de plasma préalablement filtré (0,22  $\mu\text{m}$ ), additionné de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de 1 M de citrate de sodium dans 20 mM d'HEPES, pH 7,4. Aucune agglomération de billes n'a été observée au cours des 2 h d'incubation à température ambiante et sous agitation en présence du plasma. Les protéines ont été désorbées grâce à une élution en 2 étapes inspirée de Boschetti *et al.* (2007). Les billes ont d'abord été incubées 2 fois avec 100  $\mu\text{L}$  du réactif composé de 4 M d'urée, 1% (w/v) de CHAPS, 5% (v/v) d'acide acétique pendant 15 min, puis 2 fois avec 100  $\mu\text{L}$  de 6 M de guanidine-HCl, pH 6 pendant 15 min. Pour chacune des colonnes, les 4 fractions d'élution ont été rassemblées, concentrées par centrifugations répétées à 14°C dans des concentrateurs Vivaspin Hydrosart (2000 MWCO, Sartorius Stedim Biotech), reprises dans 0,5 M de triéthylammonium bicarbonate (TEAB), pH 8,5 (Sigma-Aldrich Corporation) puis conservées à -80°C. Le contenu en protéines a été déterminé à l'aide du kit FluoroProfile (Sigma-Aldrich Corporation), avec la BSA comme standard.

## DIGE-2D

Les cyanines fluorescentes, les réactifs ainsi que les appareils utilisés pour la DIGE-2D ont été fournis par GE Healthcare (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Allemagne), à l'exception de quelques produits spécifiés.

**Marquage DIGE des protéines.** De chaque solution protéique à 5 mg/mL dans 30 mM de Tris, 7 M d'urée, 2M de thiourée, 4% (w/v) de CHAPS, dont le pH a été ajusté à 8,5, 50  $\mu\text{g}$  de protéines ont été marquées pendant 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière avec 400 pmol d'une des cyanines fluorescentes Cy3 ou Cy5, fraîchement reconstituées à 400  $\mu\text{M}$  dans du diméthylformamide anhydre (Sigma-Aldrich Corporation). Le standard interne, formé par le mélange de 25  $\mu\text{g}$  de chacun des échantillons de l'expérience, a été marqué en parallèle avec

la cyanine Cy2. Les réactions ont été stoppées par l'ajout de 1 mM final de lysine (Sigma-Aldrich Corporation). A la suite du marquage, les échantillons ont été dilués dans 1 volume d'une solution de 7 M d'urée, 2M de thiourée, 4% (w/v) de CHAPS, 2% (w/v) de dithiothréitol (DTT), 2% (v/v) d'IPG buffer pH 4-7 ou 3-11 non linéaire. Les échantillons marqués avec Cy2, Cy3 et Cy5 ont alors été combinés (150 µg) selon le plan expérimental défini pour chaque expérience.

**Séparation des protéines par IEF puis SDS-PAGE.** Les échantillons ont été déposés en cupules, du côté anodique, à la surface de bandelettes de gel d'acrylamide (Immobiline DryStrip Gels) de 24 cm, pH 4-7 ou 3-11 non linéaire, préalablement réhydratées durant 12 h par la solution DeStreak. L'isoélectrofocalisation (IEF) des protéines s'est déroulée dans l'Ettan IPGphor 3 à 20°C, à 75 µA/bandelette, jusqu'à ce que 40,3 kVh (16h) soient délivrés. L'IEF terminée, les bandelettes ont été équilibrées 15 min dans une solution de 50 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 6 M d'urée, 30 % (v/v) de glycérol, 2 % (w/v) de SDS et 1 % (w/v) de DTT, ce dernier remplacé par 2,5 % (w/v) d'iodoacétamide dans un second bain de 15 min. La séparation par SDS-PAGE s'est réalisée à 25°C sur le système Ettan DALTsix à travers des gels (non commerciaux) à 12,5 % d'acrylamide à 1 W/gel pendant 1 h puis 17 W/gel en suivant le front de migration.

**Quantification DIGE de l'expression protéique.** Les images DIGE ont été acquises en scannant les gels directement à travers les plaques de verre (à faible fluorescence) à l'aide de l'Ettan DIGE Imager selon les longueurs d'onde d'excitation et d'émission correspondant à chaque cyanine Cy2, Cy3 ou Cy5, avec une résolution de 100 µm. Les images ont ensuite été alignées puis les variations relatives (par rapport au CTRL) d'expression protéique, induites par les différentes doses d'oxaliplatine, analysées statistiquement à travers l'ensemble des gels par le logiciel Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Royaume-Uni). Les spots protéiques ont été considérés comme sous-exprimés lorsque les ratios DIGE étaient  $\leq -1,3$  ( $p \leq 0,05$ ) et sur-exprimés lorsque les ratios DIGE étaient  $\geq 1,3$  ( $p \leq 0,05$ ).

**Digestion des spots protéiques.** Les spots protéiques d'intérêt ont été prélevés directement sur les gels DIGE, fixés sur les plaques de verre et conservés après scan dans une solution de fixation contenant 10% de méthanol et 7,5% d'acide acétique, par le robot Ettan Spot Picker, à partir d'une liste générée par le logiciel d'analyse d'images Progenesis SameSpots. Ils ont ensuite été digérés à la trypsine pendant 15 h dans une atmosphère sans kératine, à l'aide du

kit ProteoExtract All-in-One Trypsin Digestion (Merck, Darmstadt, Allemagne) en suivant le protocole du fournisseur. Avant dépôt sur plaque MALDI, mélangés à la matrice acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France) à la concentration de 5 mg/mL dans 50% d'ACN dans l'eau milliQ, avec 0,1% de TFA, les digestats ont été dessalés sur ZipTip C18 (Millipore, Billerica, MA, USA).

## Couplage iTRAQ / OFFGEL / RPLC

Le couplage iTRAQ / OFFGEL / RPLC fait l'objet du chapitre de livre suivant (Annexe 1):

*"OFFGEL-Isoelectric focusing fractionation for the analysis of complex proteome"*.

Ernoul E and Guette C.

Neuroproteomics, Neuromethods, vol.57, Springer Protocols, Humana Press, Ed.: Li KW.

**A paraître en juin 2011.**

**Digestion des protéines et marquage des peptides à l'iTRAQ.** De chaque solution protéique à 5 mg/mL dans 0,5 M de triéthylammonium bicarbonate (TEAB) à pH 8,5 (Sigma-Aldrich Corporation), 100  $\mu$ g de protéines ont été réduites pendant 1h à 60°C avec 5 mM de tris-(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP). Les cystéines ont ensuite été bloquées à l'aide de 10 mM de methyl methanethiosulfonate (MMTS) à température ambiante pendant 10 min. Les protéines ont alors été digérées pendant 40h à 37°C par 10  $\mu$ g de trypsine traitée au L-(tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone (TPCK, inhibiteur de l'activité chymotrypsique contaminante) en présence de CaCl<sub>2</sub> (AB SCIEX, Foster City, CA, USA). Chaque solution peptidique a été marquée pendant 3h à température ambiante à l'aide d'un des réactifs iTRAQ (iTRAQ Reagents Multiplex Kit, AB SCIEX) précédemment reconstitué dans 70  $\mu$ L d'éthanol. La réaction a été stoppée par l'ajout d'eau milliQ puis les échantillons marqués à l'iTRAQ, respectivement avec les étiquettes de masse 114, 115, 116, 117, ont été combinés selon un plan expérimental défini pour chaque expérience.

**Fractionnement des peptides par IEF-OFFGEL.** Pour la séparation des peptides en fonction du pI, l'appareil 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies) a été utilisé en mode 24 puits. Avant l'isoélectrofocalisation, le mélange peptidique a été dessalé sur cartouche Sep-Pak C18 (Waters Corporation, Milford, MA, USA), puis ressolubilisé dans 3,6 mL d'une solution à 2,4% (v/v) de glycérol et 1% (v/v) d'IPG buffer, pH 3-10 (GE

Healthcare). Après que la bandelette de gel d'acrylamide (Immobiline DryStrip Gels, GE Healthcare) de 24 cm, pH 3-10 linéaire, a été réhydratée pendant 15 min avec cette même solution, 150 µL d'échantillon peptidique ont été chargés dans chacun des 24 puits. La focalisation des peptides s'est déroulée à 20°C jusqu'à ce que 50 kVh soient délivrés. Le fractionnement terminé, chacune des 24 fractions peptidiques a été collectée et les puits ont été rincés avec 200 µL d'une solution d'eau milliQ/méthanol/acide formique (49/50/1). Après 15 min, chaque fraction de rinçage a été mélangée avec sa fraction peptidique correspondante. Toutes les fractions ont alors été évaporées par centrifugation sous-vide puis maintenues à -20°C. Au moment de réaliser la séparation par nano-RPLC, les fractions ont été resuspendues dans 20 µL d'eau milliQ avec 0,1% (v/v) de TFA.

**Séparation des peptides par nano-RPLC.** Les échantillons peptidiques ont été séparés sur la chaîne Ultimate 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), pilotée par le logiciel Chromeleon (Dionex Corporation), en utilisant une colonne C18 (PepMap100, 3 µm, 100 Å, 75 µm id x 15 cm, Dionex Corporation) à un flux de 300 nL/min. La phase A est constituée de 2% d'ACN dans l'eau milliQ, avec 0,05% de TFA et la phase B de 80% d'ACN dans l'eau milliQ, avec 0,04% de TFA. Chaque solution peptidique a d'abord été dessalée pendant 3 min avec uniquement la phase A sur la pré-colonne. Lors de la mise en place du protocole expérimental pour l'amélioration de la couverture protéomique, associant marquage iTRAQ et fractionnement par IEF-OFFGEL (Ernoul *et al.*, 2008), la séparation par nano-RPLC s'opérait durant 60 min, selon le gradient suivant: 0 à 20% de B en 10 min, 20 à 55% de B en 45 min et 55 à 100% de B en 5 min. Plus tard, lors de l'étude du protéome intracellulaire puis du sécrétome de la lignée SH-SY5Y, la séparation par nano-RPLC s'est opérée durant 95 min, selon le gradient suivant: 0 à 20% de B en 10 min, 20 à 50% de B en 65 min et 50 à 100% de B en 20 min. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 214 nm. Après 11 min d'expérience, les fractions peptidiques ont été déposées pendant 10 s à l'aide du robot Probot microfraction collector (Dionex Corporation) directement sur une plaque MALDI (1664 dépôts par plaque, AB SCIEX). La matrice acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA, LaserBio Labs) à la concentration de 2 mg/mL dans 70% d'ACN dans l'eau milliQ, avec 0,1% de TFA, a été ajoutée à l'éluat à un flux de 1,2 µL/min.

Pour le fractionnement des peptides par SCX, les étapes d'éluion suivantes ont été suivies: 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM et 1000 mM de NaCl en injections de 20 µL.

## Spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF

**SM et SM/SM.** Les analyses par spectrométrie de masse SM et SM/SM ont été assurées par le 4800 MALDI TOF/TOF (AB SCIEX). Les dépôts mélangés à la matrice sur plaque MALDI, suite à la digestion trypsique des spots DIGE-2D ou au fractionnement des peptides par nano-RPLC, ont tout d'abord été criblés en SM simple en mode réflecteur positif de 1500 tirs laser. Les spectres SM ont été acquis entre 800 (puis 1000) et 4000 uma. Dans les dépôts par nano-RPLC, l'ion parent du [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptide B ( $m/z = 1570,677$ , Sigma-Aldrich Corporation), dilué dans la matrice (30 fmol/dépôt) a été utilisé pour la calibration interne de l'appareil. Les ions précurseurs les plus intenses (jusqu'à 12 par dépôt) caractérisés par un rapport signal/bruit > 12 ont ensuite été automatiquement sélectionnés puis fragmentés à une énergie de collision de 1 kV avec l'air utilisé comme gaz de collision (pression d'environ  $2.10^6$  Torr).

**Analyse des spectres SM/SM.** Les spectres SM/SM obtenus par l'analyse des spots DIGE-2D ont été traités par le logiciel GPS Explorer (AB SCIEX) en utilisant l'algorithme de recherche Mascot (Matrix Science, Boston, MA, USA) pour l'identification des protéines à partir d'au moins 2 peptides, avec une limite de précision massique posée à 50 uma et selon un score de confiance  $\geq 95$  %, après interrogation de la base de données SwissProt avec *Homo sapiens* comme espèce. Concernant l'analyse iTRAQ, les identifications peptidiques et protéiques ont été accomplies à partir des spectres SM/SM à l'aide du logiciel ProteinPilot v2.0 puis v3.0 et de l'algorithme Paragon (AB SCIEX, Shilov *et al.*, 2007) après consultation de la base Uniprot/Swissprot avec *Homo sapiens* comme espèce et la modification des cystéines par le MMTS comme paramètre fixe (les autres facteurs concernant le clivage par la trypine ou encore la précision des masses du précurseur et du fragment fils, sont des fonctions intégrées du logiciel). Un indice de confiance dit "unused score" > 1,3 a été imposé au logiciel ProteinPilot afin d'atteindre 95% de confiance. Un faible taux de fausses découvertes a été estimé (< 1%).

## Quantification iTRAQ de l'expression protéique

Le logiciel iQuantitator, récemment développé par Schwacke *et al.* (2009) a été employé afin d'interpréter statistiquement les données iTRAQ provenant de la compilation de l'ensemble des expériences et d'estimer les variations relatives (par rapport au CTRL) d'expression

protéique induites par les différentes doses d'oxaliplatine. Le logiciel a permis de générer les moyennes, médianes et intervalles de crédibilité à 95% pour les différents changements d'expression en intégrant les données obtenues grâce au logiciel ProteinPilot (AB SCIEX) pour l'ensemble des peptides ayant permis d'identifier chaque protéine, ceci à travers les différents réplicats. Les protéines ont été considérées comme sous-exprimées lorsque les ratios iTRAQ étaient  $< 1$  avec des bornes supérieures d'intervalles de crédibilité  $< 1$ . A l'inverse, les protéines ont été considérées comme sur-exprimées lorsque les ratios iTRAQ étaient  $> 1$  avec des bornes inférieures d'intervalles de crédibilité  $> 1$ . L'amplitude de l'intervalle de crédibilité pour une protéine donnée dépend à la fois du nombre de peptides identifiés et du nombre de spectres utilisables pour la quantification. Lorsque de nombreux peptides étaient à disposition, il a été possible de détecter de très faibles variations d'expression.

## **Analyses bioinformatiques**

**Interprétation biologique des données protéomiques.** Deux puissantes méta-bases de données (Malik *et al.*, 2010) ont aidé à extraire les informations biologiques pertinentes à partir des listes de protéines variantes. L'analyse de l'ontologie génique (Gene Ontology, GO) a été effectuée par le biais de la base DAVID v6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery ; Dennis *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2009 ; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), spécialisée dans l'analyse de la sur-représentation des termes GO au sein des listes protéiques. Les réseaux d'interactions protéiques ont été construits à l'aide de la base STRING v8.3 (Search Tool for the Retrieval of INteracting Genes/proteins ; von Mering *et al.*, 2003, Jensen *et al.*, 2009 ; <http://string-db.org/>), avec les paramètres d'analyse suivants: espèce *Homo sapiens*, score de confiance élevé, de 0,700. STRING incorpore les données de plusieurs bases de données (IntAct, BioGRID, HPRD, MINT, DIP et BIND) et répertorie les interactions protéine-protéine physiques ou fonctionnelles, expérimentales ou prédites *in silico*, reposant sur la synténie, la co-occurrence, la co-expression, les données de la littérature, l'expérimentation (coimmunoprécipitation ou double-hybride), les gènes de fusion ou les bases de données. Les groupes protéiques fonctionnels ont été dégagés manuellement sur les réseaux à l'aide des données GO et de la littérature.

**Prédiction de la sécrétion des protéines.** Le programme SignalP v3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) a été utilisé afin de prédire les protéines capables d'entrer dans la voie de sécrétion dépendante du reticulum endoplasmique (RE)/Golgi, dite classique, selon que la probabilité qu'elles portent un peptide signal en N-ter est  $\geq 0,90$ . L'outil ProTeus (PROtein TErminUS ; Bahir and Linial, 2005 ; <http://www.proteus.cs.huji.ac.il>) a permis de vérifier si les protéines portant un peptide signal en N-ter possédaient aussi en C-ter le signal de rétention dans le RE de séquence (K)DEL (Lys-Asp-Glu-Leu). Le programme SecretomeP v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) a été utilisé afin de prédire les protéines sécrétées par la voie non classique, indépendante du RE/Golgi, selon que le score est  $\geq 0,50$  et que la probabilité que les protéines portent un peptide signal en N-ter selon SignalP est  $< 0,90$ .

**Associations maladie-gène.** Les pathologies neurologiques associées aux gènes dont les produits protéiques ont été régulés par l'oxaliplatine ont été recherchées dans le catalogue des gènes et désordres génétiques humains, OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man ; Hamosh *et al.*, 2002 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) ainsi que dans la base de données archivant les études d'associations génétiques humaines publiées, GAD (Genetic Association Database ; Becker *et al.*, 2004 ; <http://geneticassociationdb.nih.gov/>).

**Outils d'analyse en protéomique.** Les informations concernant les séquences des protéines et leurs caractéristiques biochimiques ont été obtenues à partir du catalogue UniProt (Universal Protein Resource ; <http://www.uniprot.org/>). Le pI et la masse théoriques des peptides et protéines ainsi que le résultat de la digestion trypsique *in silico* des protéines d'intérêt ont été obtenus grâce aux outils "Compute pI/Mw" et "PeptideMass" du serveur dédié à la protéomique ExPASy (Expert Protein Analysis System ; <http://www.expasy.ch/>).

## Analyse par western-blot

Les échantillons protéiques contenant 20, 50 ou 100  $\mu\text{g}$  de protéines intracellulaires (extraits totaux) des cellules SH-SY5Y, 20 ou 50  $\mu\text{g}$  de protéines des surnageants de culture, 300  $\mu\text{g}$  de protéines des ganglions spinaux de rat, ont été séparés selon le système SDS-PAGE de Laemmli, en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad Laboratories) puis électro-transférés sur membranes de PVDF (polyfluorure de

vinylidène, Millipore). Les membranes ont été saturées puis hybridées à 4°C toute la nuit avec les anticorps primaires suivants dilués au 1/500: anti-Stathmin, anti-Ezrin, anti-Calmodulin (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), anti-PARP-1, anti-Matrin-3, anti-p54nrb (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-Neudesin (Everest Biotech Ltd, Oxfordshire, Royaume-Uni), anti-Neudesin (Proteintech Group Inc., Chicago, IL, USA). Des conjugués IgG-HRP (horseradish peroxydase) dilués au 1/5000 (Santa Cruz) ont été utilisés comme anticorps secondaires. La révélation des signaux protéiques s'est réalisée par le système ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Bio-Rad Laboratories). Les analyses par western-blot ont été effectuées au moins 3 fois pour chaque protéine.

# RESULTATS

# Mise en place d'un protocole expérimental pour l'amélioration de la couverture protéomique, associant marquage iTRAQ et fractionnement par IEF-OFFGEL

Cette étude a fait l'objet de la publication suivante:

*"Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation"*.  
Ernoul E, Gamelin E, Guette C.  
Proteome Science 2008; 6:27.

Le marquage iTRAQ des peptides se présente comme un puissant outil en protéomique quantitative permettant d'étudier l'expression différentielle des protéines entre plusieurs échantillons. L'analyse protéomique au niveau peptidique est devenue une méthode de choix pour les échantillons très complexes. Ce succès repose sur le développement de méthodes de fractionnement peptidique toujours plus efficaces afin de diminuer la complexité des échantillons avant l'analyse par spectrométrie de masse. Jusqu'alors, la méthode de référence était la chromatographie par échange de cations (SCX). Récemment, la technologie OFFGEL a émergé comme étant d'un grand intérêt en protéomique dite "shotgun" (Fraterman *et al.*, 2007). De plus, le fractionnement OFFGEL, reposant sur la séparation des peptides par isoélectrofocalisation (IEF), permet la filtration des identifications peptidiques basée sur le pI (Hörth *et al.*, 2006). La compatibilité du marquage iTRAQ avec l'IEF-OFFGEL en vue de la quantification relative et de la validation des peptides a été montrée (Lengqvist *et al.*, 2007, Chenau *et al.*, 2008). Nous avons cherché à étudier l'influence du marquage iTRAQ et du fractionnement par IEF-OFFGEL sur la couverture protéomique d'un modèle cellulaire d'échantillon très complexe, la lignée SH-SY5Y (neuroblastome humain). A cette fin, plusieurs expériences ont été réalisées (Tableau R-I).

## *Le marquage iTRAQ des peptides améliore la couverture protéomique*

La séparation de 200 µg de protéines digérées par chromatographie SCX a permis l'identification de 159 protéines dont 116 ont été caractérisées avec au moins 2 peptides

(Tableau R-I, NL-116). A partir de 4 fractions de 50 µg de protéines réduites, alkylées par le MMTS, digérées par la trypsine, marquées à l'iTRAQ, mélangées, puis séparées par chromatographie SCX, 472 protéines ont été identifiées, 310 d'entre elles à l'aide d'au moins 2 peptides (Tableau R-I, iTRAQ-310). L'ensemble des 116 protéines identifiées sans marquage (NL-116) l'a aussi été dans l'expérience iTRAQ (iTRAQ-310). Le marquage iTRAQ a donc permis d'identifier 2,7 fois plus de protéines (avec au moins 2 peptides).

Le calcul du PAI, qui représente le nombre de peptides identifiés rapporté au nombre théorique de peptides tryptiques, permet d'estimer la quantité d'une protéine particulière au sein d'un échantillon complexe (Rappsilber *et al.*, 2002). La comparaison entre l'expérience sans marquage (NL-116) et l'expérience avec marquage iTRAQ (iTRAQ-310), en utilisant la méthode de séparation des peptides par SCX, montre après marquage, un nombre plus important de protéines identifiées pour chaque gamme de PAI (Figure R-1A), en particulier 22 fois plus important avec un PAI inférieur à 0,05, valeur caractéristique des protéines présentes à plus faible concentration (Figure R-1A). Le marquage iTRAQ a donc permis d'enrichir en protéines faiblement représentées.

### ***Le marquage iTRAQ favorise l'ionisation MALDI des peptides***

Nous avons souhaité mieux comprendre l'effet du marquage iTRAQ sur le taux d'identification peptidique. L'observation des séquences des peptides identifiés non marqués a mis en évidence que 20% d'entre eux se terminaient par une lysine et 80% par une arginine (Figure R-2). En effet, l'arginine étant le résidu de plus forte affinité protonique, il confère aux peptides une meilleure capacité d'ionisation et donc facilite leur identification (Nishikaze *et al.*, 2006). Ce rapport se trouve rééquilibré après marquage iTRAQ avec 50% de peptides présentant en C-ter une lysine et 50% de peptides présentant une arginine (Figure R-2), confirmant ainsi les résultats de Ross *et al.*, (2004). Le groupement reporter du réactif iTRAQ possède 2 amines tertiaires qui, en remplaçant l'amine primaire présente sur la chaîne latérale de la lysine, augmentent l'affinité protonique et par conséquent l'ionisation des peptides terminés par une lysine. Ceci suggère que l'affinité protonique des lysines modifiées par l'iTRAQ tend à égaliser celle des arginines, rendant possible l'identification des peptides terminés par une lysine aussi bien que par une arginine.

La capacité du marquage iTRAQ à favoriser l'ionisation MALDI des peptides, en particulier des peptides terminés par une lysine, participe à l'amélioration de la couverture protéomique.

### ***Le fractionnement des peptides par IEF-OFFGEL améliore la couverture protéomique***

La séparation de 200 µg de protéines digérées non marquées à l'iTRAQ par chromatographie SCX a permis l'identification de 159 protéines dont 116 ont été caractérisées avec au moins 2 peptides (Tableau R-I, NL-116). La séparation de 200 µg de protéines digérées non marquées à l'iTRAQ par IEF-OFFGEL a permis l'identification de 285 protéines dont 184 ont été caractérisées avec au moins 2 peptides (Tableau R-I, NL-184). Le fractionnement par IEF-OFFGEL a donc permis d'identifier 1,6 fois plus de protéines (avec au moins 2 peptides).

### ***Le fractionnement des peptides marqués par IEF-OFFGEL introduit le pI comme critère supplémentaire de validation des identifications protéiques***

La qualité du fractionnement par IEF-OFFGEL des peptides marqués à l'iTRAQ a été analysée. La figure R-3A révèle que 78% des peptides marqués identifiés sont enrichis dans une unique fraction OFFGEL et qu'environ 90% d'entre eux sont présents dans au maximum 2 fractions, confirmant ainsi la distribution relatée dans d'autres études (Chenau *et al.*, 2008).

Le pI moyen des peptides marqués à l'iTRAQ identifiés dans chaque fraction OFFGEL, calculé à l'aide de l'algorithme de Bjellqvist (Bjellqvist *et al.*, 1993) et comparé aux valeurs de pH moyen théorique de chacune des 24 fractions OFFGEL (pH 3-10), est présenté figure R-3B. Le pI moyen expérimental global se trouve dévié par rapport au pH moyen théorique de  $\pm 0,43$  unités. Le pI moyen expérimental dans la zone pH 3-8 (fractions 1 à 17) se trouve dévié de  $\pm 0,34$  unités tandis que le pI moyen expérimental dans la zone pH 8-10 (fractions 18 à 24) se trouve dévié de  $\pm 0,64$  unités. En effet, l'algorithme de Bjellqvist ne considère pas les groupements iTRAQ (en N-ter et/ou sur les chaînes latérales des lysines).

Nous proposons le pI comme un filtre pour valider l'identification par SM/SM des peptides marqués à l'iTRAQ: sont exclus les peptides identifiés dans les fractions 1 à 17 dont le pI dévie de plus de 0,4 unités par rapport au pH moyen théorique des fractions ainsi que les

peptides identifiés dans les fractions 18 à 24 dont le pI dévie de plus de 0,7 unités par rapport au pH moyen théorique des fractions.

***Le protocole expérimental associant marquage iTRAQ et fractionnement par IEF-OFFGEL permet l'optimisation de la couverture protéomique***

A partir de 4 fractions de 100 µg de protéines réduites, alkylées par le MMTS, digérées par la trypsine, marquées à l'iTRAQ, mélangées (400 µg), puis séparées par IEF-OFFGEL, 879 protéines ont été identifiées, 739 d'entre elles (soit 84%) à l'aide d'au moins 2 peptides (Tableau R-I, iTRAQ-739). Le marquage iTRAQ associé au fractionnement par IEF-OFFGEL a donc permis d'identifier davantage de protéines.

La comparaison entre l'expérience utilisant la méthode de séparation de 400 µg de peptides marqués à l'iTRAQ par SCX (iTRAQ-429) et l'expérience utilisant la méthode de séparation de 400 µg de peptides marqués à l'iTRAQ par IEF-OFFGEL (iTRAQ-739), montre après IEF-OFFGEL, un nombre plus important de protéines identifiées pour chaque gamme de PAI (Figure R-1B), en particulier 2,7 fois plus important avec un PAI inférieur à 0,05 (Figure R-1B). Le marquage iTRAQ associé au fractionnement par IEF-OFFGEL a donc permis d'enrichir en protéines faiblement représentées.

La comparaison de l'ensemble des expériences menées ici conduit à dégager la supériorité du marquage iTRAQ et du fractionnement OFFGEL pour améliorer la couverture protéomique. Pour l'analyse protéomique d'échantillons très complexes, nous proposons donc le protocole expérimental, associant marquage iTRAQ et fractionnement OFFGEL, rendant possible l'identification d'au moins 700 protéines (avec au moins 2 peptides) à partir de seulement 400 µg de matériel biologique et d'un unique réplicat.

# **Application du protocole expérimental associant marquage iTRAQ et fractionnement OFFGEL à la recherche de biomarqueurs protéiques dans le plasma sanguin**

Cette étude a fait l'objet de la publication suivante:

*"A proteomic approach for plasma biomarker discovery with iTRAQ labelling and OFFGEL fractionation"*.

Ernault E, Bourreau A, Gamelin E, Guette C.

Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010; 2010:927917.

## ***Le protocole expérimental associant iTRAQ et OFFGEL suite à un préfractionnement protéique permet l'amélioration de la couverture protéomique plasmatique***

Pour l'étude du protéome plasmatique, nous avons opté pour une stratégie basée sur un fractionnement en 3 dimensions que nous avons testé sur un mélange de 10 échantillons plasmatiques de donneurs sains (Etablissement Français du Sang de Bourgogne Franche Comté, CHU de Dijon, France). Un préfractionnement protéique a tout d'abord été réalisé, par la technique commune d'immunodéplétion des 14 protéines plasmatiques les plus abondantes (MARS-Hu 14), ou par une technique alternative plus récemment développée dite d'"égalisation" des concentrations protéiques, ProteoMiner, où le plasma est incubé avec une banque combinatoire d'hexapeptides (voir INTRODUCTION). Les protéines ont ensuite été réduites, alkylées par le MMTS, digérées par la trypsine et les peptides résultants ont été marqués à l'iTRAQ, mélangés (400 µg), dessalés puis fractionnés par OFFGEL en 24 fractions entre pH 3 et pH 10. Enfin, chacune des fractions a été séparée par nano-RPLC et analysée par MALDI TOF/TOF (Figure R-4).

A partir du plasma immunodéplété, 332 protéines ont pu être identifiées dont 243 avec au moins 2 peptides tandis que le plasma "égalisé" a permis l'identification de 320 protéines dont 228 avec au moins 2 peptides (Figure R-5). Les 2 méthodes de préfractionnement apparaissent donc avoir la même efficacité en terme d'identifications protéiques. Seules 85 et

70 protéines ont été identifiées (avec au moins 2 peptides) spécifiquement par l'une des 2 approches, respectivement immunodéplétion et "égalisation" et 158 protéines ont été identifiées par les 2 méthodes qui se révèlent ici complémentaires (Figure R-5). Au total, ce sont donc 313 protéines qui ont été identifiées avec au moins 2 peptides dans le plasma sanguin après ce fractionnement en 3 dimensions (Figure R-5).

En comparaison, 400 µg de protéines dosées après immunodéplétion du plasma, réduites, alkylées par le MMTS, digérées par la trypsine mais dont les peptides résultants n'ont pas été marqués à l'iTRAQ, ont conduit à l'identification de 115 protéines après OFFGEL-RPLC-MALDI TOF/TOF.

Toutefois, 313 protéines est un nombre restreint au regard du nombre d'identifications que le protocole expérimental associant iTRAQ et OFFGEL a pu fournir à partir d'extraits cellulaires dans notre précédente étude (Ernoul *et al.*, 2008), soulignant ainsi le défi que représente le préfractionnement protéique pour améliorer la couverture protéomique plasmatique.

### ***La recherche de biomarqueurs protéiques d'intérêt clinique à partir du plasma sanguin est limitée***

Afin d'évaluer la puissance de notre stratégie à révéler des protéines de faible concentration dans le plasma, l'abondance relative des 20 protéines les plus représentées après immunodéplétion ou "égalisation" a été estimée par comptage du nombre de spectres SM/SM (Figure R-6). Il ressort que ces 20 protéines correspondent à des protéines connues comme abondantes dans le plasma sanguin. Par exemple, la quantité des chaînes alpha et beta du Fibrinogène demeure élevée malgré le traitement du plasma par ProteoMiner (Figure R-6), ceci gênant la détection des protéines de faible concentration.

Après vérification dans la littérature, la dynamique de concentration du plasma simplifié est ici de  $10^6$ - $10^7$ . A côté de l'Albumine (Serum albumin) de concentration approximative 50 mg/mL, ont pu être caractérisées des protéines de plus faible abondance (Tableau R-II) telles que l'Insulin-like growth factor binding protein 2 (15 ng/mL, Haab *et al.*, 2005) ou la Sex hormone-binding globulin (8,1 ng/mL, Cunningham *et al.*, 1984). Toutefois notre stratégie ne donne pas accès aux protéines très faiblement concentrées (de l'ordre de quelques dizaines de

pg/mL). L'immense complexité du protéome plasmatique limite l'utilisation du plasma sanguin des patients comme source directe pour rechercher des biomarqueurs protéiques d'intérêt clinique.

# **Analyse du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y traitées par l'oxaliplatine par une double approche protéomique quantitative**

Les technologies de protéomique quantitative, la DIGE-2D et le marquage iTRAQ associé au fractionnement OFFGEL, ont été utilisées pour caractériser l'effet de l'oxaliplatine sur le protéome intracellulaire total des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y.

## ***Traitement des cellules SH-SY5Y par l'oxaliplatine***

Les cellules ont été traitées par 5  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine (OX5) ainsi que par 2 fois cette dose, soit 10  $\mu\text{M}$  (OX10) et 10 fois cette dose, soit 50  $\mu\text{M}$  (OX50). Les protéines ont été extraites 24 h après le traitement. La viabilité des cellules SH-SY5Y a été déterminée par test MTT à environ 60%, 40% et 20% pour les 3 doses respectives (Figure R-7).

## ***Analyse des variations d'expression protéique par DIGE-2D***

Pour réaliser les expériences de DIGE-2D, 50  $\mu\text{g}$  de protéines de chacun des extraits totaux ont été marquées à l'aide des différents fluorochromes (cyanines). Deux séries de gels DIGE-2D ont été réalisées. Les 4 réplicats d'échantillons CTRL, OX5, OX10 et OX50 ont été séparés entre pH 3 et pH 11 (8 gels). Les 4 réplicats d'échantillons CTRL et OX10 ont aussi été comparés en zoomant sur la zone pH 4-7 (4 gels). Les analyses ont été multiplexées selon les protocoles expérimentaux présentés figure R-8. Les variations d'expression protéique d'un facteur  $\geq 1,3$  ( $p \leq 0,05$ ) à travers l'ensemble des réplicats par rapport aux échantillons CTRL ont été analysées à l'aide du logiciel Progenesis SameSpots. Parmi les 1369 spots (pH 4-7) et les 1597 spots (pH 3-11) détectés sur les gels, 65 et 84 spots respectivement étaient différentiellement exprimés après traitement à l'oxaliplatine. Suite au prélèvement des spots directement sur les gels DIGE-2D puis à leur digestion trypsique et analyse SM/SM, seules 17 protéines (13 non redondantes) ont été identifiées (avec au moins 2 peptides) à partir des gels pH 4-7 (Figure R-9B, Annexe 2). En revanche, la combinaison de spots prélevés à partir de 2

gels DIGE-2D pH 3-11 a permis d'identifier (avec au moins 2 peptides) 70 protéines dont 56 non redondantes (Figure R-9A, Annexe 3). L'analyse n'a identifié aucune protéine commune aux 2 séries de gels. Au final, un total de 69 protéines non redondantes ont été identifiées avec au moins 2 peptides par l'approche DIGE-2D, 49 étaient sous-exprimées et 20 sur-exprimées. Seules 12 protéines sont régulées après OX5 mais 42 protéines sont régulées après OX10 et 55 après OX50 avec 11 protéines régulées dans le même sens entre toutes les conditions (Figure R-10A).

### ***Analyse des variations d'expression protéique par approche iTRAQ***

Pour les expériences iTRAQ, 100 µg de protéines de chacun des extraits totaux ont été soumises à dénaturation, réduction et alkylation par le MMTS avant digestion trypsique et marquage iTRAQ avec les différentes étiquettes isobares: CTRL: 114, OX5: 115, OX10: 116, OX50: 117. Finalement, les 4 échantillons marqués ont été mélangés. Afin d'augmenter la couverture protéomique, une séparation bidimensionnelle des peptides a été réalisée avant analyse SM/SM, comme précédemment décrit par notre équipe (Ernault *et al.*, 2008). Le mélange de peptides marqués (400 µg) a tout d'abord été séparé en 24 fractions par OFFGEL-IEF entre pH 3 et pH 10, puis chaque fraction a été séparée par RPLC capillaire. Dans le but d'optimiser la caractérisation du protéome de la lignée cellulaire SH-SY5Y, 4 mélanges de peptides marqués à l'iTRAQ correspondant à 4 réplicats biologiques ont été étudiés. Au final, ce sont donc 96 fractions OFFGEL qui ont été analysées par RPLC-SM/SM (Figure R-11). La figure R-12A présente nos 4 expériences indépendantes en termes d'identification protéique. La combinaison de ces manipulations a résulté en l'identification de 2774 protéines avec au moins 2 peptides.

L'utilisation de l'analyse multiple d'échantillons marqués à l'iTRAQ pour l'amélioration de la couverture protéomique et la quantification différentielle a déjà été rapportée (Chong *et al.*, 2006). La même observation peut être faite dans notre étude avec 849 protéines identifiées de manière reproductible dans les 4 expériences, un incrément d'identification protéique de 25% trouvé entre la première et la deuxième analyse, de 15% entre les expériences 1+2 et la troisième et finalement de 5% entre les expériences 1+2+3 et la dernière. Il semble qu'un plateau est atteint après 4 analyses (Figure R-12B).

Les variations d'expression des protéines au sein des échantillons traités par l'oxaliplatine par rapport au CTRL (non traité) à travers l'ensemble des 4 manipulations ont été obtenues grâce au logiciel statistique nouvellement développé iQuantitor (Schwacke *et al.*, 2009). Un total de 34009 spectres SM/SM ont été générés, correspondant à 10762 peptides uniques dans la base de données *Homo sapiens* après que les résultats fournis par le logiciel ProteinPilot ont été filtrés par le logiciel iQuantitor. Ceci a résulté en la quantification de 2417 protéines dont 1557 identifiées avec au moins 2 peptides. Il s'avère que 119 protéines identifiées avec au moins 2 peptides, sont significativement régulées dans au moins 1 condition OX5, OX10 ou OX50 (Annexe 4), avec 71 protéines sous-exprimées, 46 protéines sur-exprimées et seulement 2 protéines différemment régulées entre les conditions de traitement. Comme pour la DIGE-2D, la majorité des variations d'expression protéique obtenues après marquage iTRAQ apparaissent dose-dépendantes. Au total, dans notre analyse iTRAQ, seules 12 protéines sont régulées après OX5 mais 54 protéines sont régulées après OX10 et 89 après OX50 avec 21 protéines régulées dans le même sens entre les conditions OX10 et OX50 (Figure R-10B).

### ***Comparaison des deux approches DIGE-2D et iTRAQ***

La comparaison des protéines identifiées et différenciellement exprimées après traitement à l'oxaliplatine pendant 24 h par les 2 approches protéomiques quantitatives a mis en évidence que 69 protéines, dont 56 parmi les 1597 spots détectés sur les gels pH 3-11, soit 3,5% des protéines, ont été différenciellement quantifiées par DIGE-2D et que 119 protéines ont été différenciellement régulées parmi les 2774 identifiées après marquage iTRAQ, soit 4,3% des protéines. Ont été identifiées comme variantes par DIGE-2D 21 protéines qui l'ont aussi été après marquage iTRAQ (Figure R-10C). De ces 21 protéines communes, 19 protéines (90%) ont montré une régulation similaire. Ainsi la variation de 48 protéines a été spécifiquement détectée par DIGE-2D. Cependant, après vérification, il a été possible d'identifier 47 de ces protéines, soit 98%, dans nos expériences iTRAQ mais sans altération significative d'expression.

## ***Validation par western-blot de l'expression protéique différentielle***

Afin de valider les résultats de notre analyse protéomique, quelques protéines ont été étudiées par un autre test biochimique. Les western-blots accompagnés des graphiques statistiques selon les données de iQuantitator ou des figures de spots DIGE-2D sont présentés figure R-13. Globalement, une bonne corrélation existe entre les résultats de la protéomique (Annexes 2, 3, 4) et les western-blots pour ces quelques protéines choisies arbitrairement. L'expression de la Stathmine, de la Calmoduline et de l'Ezrine diminue de manière dose-dépendante. L'oxaliplatine n'a pas d'effet sur les protéines Matrin-3 et NonO (p54nrb). Nos expériences iTRAQ ont mis en évidence la sous-expression par l'oxaliplatine de PARP-1, une enzyme clé de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Le western-blot de la protéine montre le clivage de PARP-1 avec l'apparition graduelle, selon la dose d'oxaliplatine, dans les cellules traitées du produit de clivage de 89 kDa à partir de la proenzyme de 113 kDa. Cette protéolyse est réalisée spécifiquement par les caspases durant la phase d'exécution du programme apoptotique et est un marqueur d'apoptose connu (Koh *et al.*, 2005).

## ***Analyse des protéines régulées par l'oxaliplatine***

Au total, les résultats cumulés obtenus par les 2 techniques ont fourni une liste de 167 protéines variantes (Figure R-9C). Pour évaluer la pertinence de ces données et guider leur interprétation, une description des fonctions biologiques et localisations subcellulaires a été recherchée pour chaque protéine dans la base d'annotations Gene Ontology (GO) via le logiciel DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery ; Dennis *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2009 ; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Selon la figure R-14, la majorité des protéines régulées est nucléaire (21,9%). Trois autres compartiments cellulaires sont particulièrement représentés, le cytosquelette (18,6%), la mitochondrie (12,6%) et le reticulum endoplasmique (4,2%), en comparaison avec les proportions protéiques assignées à ces compartiments dans le protéome humain, respectivement 3%, 4% et 3% d'après Anderson *et al.* (2004). Ces résultats suggèrent donc que des fonctions cellulaires associées au cytosquelette, à la mitochondrie et au reticulum endoplasmique puissent être spécifiquement dérégulées par l'oxaliplatine dans le modèle de neurotoxicité.

Les voies biologiques majeures dont les protéines sont régulées ont pu être dégagées et discutées dans le contexte bibliographique en lien avec notre sujet. Ainsi, l'oxaliplatine altère

l'expression de protéines impliquées dans différentes fonctions cellulaires telles que 1) la réponse aux dommages à l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire, 2) le stress oxydatif et le métabolisme énergétique, 3) le stress protéotoxique et la résistance multidroge, 4) la plasticité neuronale et l'homéostasie calcique. Cette synthèse est détaillée dans la partie DISCUSSION et présentée au travers des 4 tableaux R-VII, R-VIII, R-IX et R-X. De la lecture de ces tableaux, il ressort que les 2 approches protéomiques ont contribué de manière complémentaire à extraire ces différentes voies biologiques.

Les connexions entre les 167 protéines variantes identifiées ont été analysées par bioinformatique à l'aide de la base de données STRING (Search Tool for the Retrieval of INteracting Genes/proteins ; von Mering *et al.*, 2003, Jensen *et al.*, 2009 ; <http://string-db.org/>), répertoriant les interactions protéine-protéine physiques et fonctionnelles, connues ou prédites. Un réseau protéique a été obtenu avec 8 groupes protéiques majeurs : reconnaissance des dommages à l'ADN, régulation de l'expression génique, métabolisme énergétique et production d'ATP, synthèse protéique, maturation des protéines et réponse au stress, dégradation des protéines, dynamique des microtubules et enfin dynamique du cytosquelette d'actine et calcium (Figure R-15), appuyant ainsi nos hypothèses quant aux mécanismes de la neurotoxicité de l'oxaliplatine précités. L'étude des relations interactomiques révèle aussi que les groupes mis en évidence sont principalement formés par des protéines sous-exprimées (Figure R-16B) à l'exception du groupe des protéines impliquées dans la réponse au stress qui sont elles sur-exprimées suite au traitement à l'oxaliplatine (Figure R-16A). En revanche, le médicament affecte de manière moins homogène l'expression des protéines contrôlant la production d'ATP et la dynamique du cytosquelette (Figure R-16). Enfin, un enrichissement des différents groupes en protéines est observé avec l'augmentation de la dose d'oxaliplatine (Figure R-17). S'il apparaît que 5  $\mu\text{M}$  altèrent surtout le cytosquelette (Figure R-17A), tous les groupes protéiques sont visualisables après 10  $\mu\text{M}$  (Figure R-17B) excepté celui des protéines impliquées dans la reconnaissance des dommages à l'ADN qui ne ressort quant à lui qu'après 50  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine (Figure R-17C).

### ***Pathologies neurologiques reliées aux protéines régulées***

De nombreuses protéines sont impliquées dans des pathologies du système nerveux chez l'Homme et les gènes correspondants ont été répertoriés dans les bases de données des maladies humaines OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man ; Hamosh *et al.*, 2002 ;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) ou encore GAD (Genetic Association Database ; Becker *et al.*, 2004 ; <http://geneticassociationdb.nih.gov/>). Dans cette étude, 25 gènes codant pour des protéines variantes suite au traitement à l'oxaliplatine des cellules SH-SY5Y sont décrits dans ces bases de données comme liés à des pathologies neurologiques, soit 5 dans la première base, 11 dans la seconde base et 9 inscrits dans les 2 bases. Ces gènes sont présentés dans le tableau R-III. Certains sont impliqués dans les maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaques (*HSPD1*, *STMN1*), la sclérose latérale amyotrophique (*TARDBP*, *FUS*), la maladie de Parkinson (*HSPA9*, *ALDH2*, *PARP1*, *HSPA5*), la maladie d'Alzheimer (*VGF*, *ATP5C1*, *GAPDH*, *TOMM40*, *PRDX3*), et la maladie de Huntington (*HDAC1*). D'autres sont associés aux maladies du système nerveux central (SNC) de Sandhoff et de Tay-Sachs (*HEXB*), à la malformation du SNC de Miller-Dieker (*YWHAE*), à la neuropathie périphérique appelée maladie de Charcot-Marie-Tooth (*GARS*, *LMNA*), à des maladies neuromusculaires (*TPM3*, *VCP*, *ACTB*, *SEPT9*), ou à la surdité (*RDX*, *ACTG1*, *MYH9*).

# **Analyse protéomique quantitative du sécrétome des cellules SH-SY5Y différenciées traitées par l'oxaliplatine**

## ***Différenciation des cellules SH-SY5Y***

Afin de faciliter la découverte de biomarqueurs associés à la neurotoxicité de l'oxaliplatine à partir du sécrétome, les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y ont été différenciées de manière à les maintenir stables dans un milieu de culture pourtant dépourvu de sérum. Pour cela, le protocole de différenciation séquentiel décrit pour ces cellules par Encinas *et al.* (2000) a été suivi. Les cellules ont tout d'abord été traitées par 10  $\mu$ M d'acide rétinoïque pendant 5 j en présence de sérum. Après plusieurs lavages, elles ont ensuite été traitées avec 50 ng/mL de BDNF dans un milieu sans sérum pendant 7 j au cours desquels elles ont acquis un phénotype neuronal typique avec de longs prolongements neuritiques interconnectés (Figure R-18). Le dosage de l'adénylate kinase, protéine normalement cytoplasmique, dans le surnageant de culture indique qu'un taux de base de 5,4% ( $\pm$  0,1) de protéines intracellulaires contaminent le sécrétome après 3 j supplémentaires de culture dans ces conditions (Figure R-19).

## ***Analyse des variations d'expression protéique par approche iTRAQ***

La stratégie iTRAQ-OFFGEL-RPLC-SM/SM (Ernoul *et al.*, 2008) a été utilisée pour analyser en profondeur le milieu de culture conditionné de la lignée SH-SY5Y différenciée puis traitée pendant 72 h, afin de permettre aux protéines d'être sécrétées, par 1  $\mu$ M (OX1) ou 10  $\mu$ M (OX10) d'oxaliplatine. Le diagramme de la procédure est présenté figure R-20. Les protéines (100  $\mu$ g) du surnageant de culture sans sérum des cellules SH-SY5Y collecté, filtré et concentré, ont été dénaturées, réduites et alkylées par le MMTS. Puis, les protéines ont été digérées par la trypsine et les peptides résultants ont été marqués à l'iTRAQ: CTRL: 115, OX1: 116, OX10: 117 avant d'être mélangés. Ce mélange très complexe de peptides marqués (300  $\mu$ g) a ensuite été séparé en 24 fractions par OFFGEL-IEF entre pH 3 et pH 10, puis chaque fraction a été re-séparée par RPLC capillaire et analysée par MALDI TOF/TOF. Dans le but d'optimiser la caractérisation du sécrétome de la lignée cellulaire SH-SY5Y après

traitement à l'oxaliplatine, 2 mélanges de peptides marqués à l'iTRAQ correspondant à 2 réplicats biologiques ont été étudiés ayant donc abouti à 48 fractions OFFGEL qui ont été analysées par RPLC-SM/SM. La combinaison de ces manipulations a généré un total de 52002 spectres SM/SM, correspondant à 6724 peptides uniques dans la base de données *Homo sapiens* après que les résultats fournis par le logiciel ProteinPilot ont été filtrés par le logiciel iQuantitor. Ceci a résulté en la quantification de 1952 protéines dont 1067 identifiées avec au moins 2 peptides. Plusieurs cytokines et facteurs de croissance tels que CSF-1, BMP-1, GDF-15, VGF, HDGF, VEGF-A, VEGF-B, PDGF-A, PDGF-D, connus comme étant des protéines sécrétées de très faible abondance ont pu être détectées dans le sécrétome global des cellules SH-SY5Y différenciées, démontrant ainsi la sensibilité de la stratégie employée.

Les variations quantitatives des protéines au sein des milieux de culture conditionnés des cellules traitées par l'oxaliplatine par rapport au CTRL (non traité) à travers les 2 manipulations ont été obtenues grâce au logiciel statistique iQuantitor. Ainsi 220 protéines identifiées avec au moins 2 peptides (Annexe 5 et Annexe 6) sont régulées dans au moins 1 condition OX1 ou OX10, avec 48 protéines régulées après OX1 et 194 protéines régulées après OX10 (Figure R-21B).

### ***Analyse des voies de sécrétion***

Les 220 protéines variantes identifiées dans le milieu de culture conditionné ont ensuite été analysées à l'aide de programmes bioinformatiques développés dans le but de prédire si les protéines sont sécrétées et les voies de sécrétion empruntées en fonction de leur séquence en acides aminés (Figure R-21A). Ainsi, 79 d'entre elles (soit 36%) sont prédites par le logiciel SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) comme portant un peptide signal en N-ter (probabilité  $\geq 0,90$ ). Après vérification à l'aide de l'outil ProTeus (PROtein TERminUS ; Bahir and Linial, 2005 ; <http://www.proteus.cs.huji.ac.il>), aucune de ces 79 protéines ne possède en C-ter le signal de rétention dans le RE de séquence KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu). D'autre part, l'analyse par le logiciel SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) prédit 47 protéines (soit 21%) relarguées par la voie non classique indépendante du RE/Golgi (probabilité SignalP  $< 0,90$  et score SecretomeP  $\geq 0,50$ ). Ces protéines et leur voie de sécrétion sont listées dans les annexes 5 et 6. Au final, notre sécrétome altéré par l'oxaliplatine se trouve enrichi à 57% (126 protéines sur 220) de protéines susceptibles d'être

sécrétées. Afin d'évaluer l'efficacité de notre protocole en vue d'identifier des protéines sécrétées régulées, nous avons repris nos résultats concernant le protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y traitées à l'oxaliplatine et analysé les 119 protéines variantes selon la méthode iTRAQ-OFFGEL-CL SM/SM à l'aide des mêmes programmes bioinformatiques de prédiction. Il apparaît que 13 protéines, c'est-à-dire 6,1 fois moins que pour le sécrétome, possèdent un peptide signal (2 d'entre elles possèdent aussi la séquence KDEL de rétention dans le RE) et 31 protéines, soit 1,5 fois moins que pour le sécrétome, sont prédites sécrétées par la voie non classique indépendante du RE/Golgi (Figure R-22). Ces protéines et leur voie de sécrétion sont listées dans l'annexe 4. Parmi ces 42 protéines prédites sécrétées, 28 n'ont pas été détectées comme régulées au sein du sécrétome après traitement des cellules à l'oxaliplatine (Figure R-22). Parmi ces dernières, 10 n'ont en fait pas été identifiées dans le sécrétome et 18 ont été identifiées mais sans variation d'expression significative.

### ***Comparaison à la base de données de l'HUPO***

La liste des protéines prédites sécrétées, régulées par l'oxaliplatine (126 protéines), identifiées dans le milieu de culture conditionné de la lignée SH-SY5Y différenciée, a aussi été comparée à la base de données PPP (Plasma Proteome Project ; Omenn *et al.*, 2005) de l'HUPO. Y ont été trouvées 29 de nos protéines (23%), dont les protéines neurone-caractéristiques Cadherine-2, Cystatine-C, Dopamine beta-hydroxylase, NCAM-1, NCAM-L1, Sécrétogranine-3, Contactine-2. Notons que parmi les 29 protéines, 7 ne possèdent pas de peptide signal (Tableau R-IV).

### ***Pathologies neurologiques reliées aux protéines sécrétées régulées***

Parmi les gènes codant pour les protéines prédites sécrétées révélées comme variantes par l'étude du sécrétome des cellules SH-SY5Y différenciées puis traitées à l'oxaliplatine, 32 sont décrits dans les bases de données des maladies humaines OMIM et GAD comme liés à des pathologies neurologiques, soit 2 dans la première base, 22 dans la seconde base et 8 inscrits dans les 2 bases. Ces gènes sont présentés dans le tableau R-V. Certains sont impliqués dans les maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaques (*LICAM*, *MMP2*, *STMN1*), la sclérose latérale amyotrophique (*CST3*), la maladie de Parkinson (*DBH*, *B2M*, *EFNA5*), la

maladie d'Alzheimer (entre autres *VGF*, *PRDX3*, *APP*, *PPIF*, *PSAP*, *SORCS1*, *SPARC*, *TIMP2*, *TPT1*), la maladie de Huntington (*UCHL1*) et la maladie de Creutzfeldt-Jakob (*ADAM10*). D'autres sont associés à la neuropathie périphérique appelée polyradiculoneuropathie (*CNTN2*), à des maladies neuromusculaires (*TPM1*, *ACTB*, *AGRN*, *COL6A1*, *HSPG2*), ou à la surdité (*ACTG1*).

### ***Analyse des protéines sécrétées sur-exprim es suite au traitement par l'oxaliplatine***

Sont d nombr es dans le milieu conditionné des cellules SH-SY5Y différenciées 118 protéines sur-exprim es sur les 220 identifi es comme régulées (Annexe 5). Les protéines sous-exprim es sont pr sent es annexe 6.

Parmi les 79 protéines portant un peptide signal, 9 sont régulées après OX1 et 77 sont régulées après OX10 (7 protéines sont communes). Toutefois, si 44,4% (4 sur 9) des protéines régulées après OX1 sont sur-exprim es, seulement 1,3% (1 sur 77) des protéines régulées après OX10 voient leur taux augmenté (Figure R-21B). Cette unique protéine, Bap31 (B-cell receptor-associated protein 31), est aussi sur-exprim e après OX1 (Annexe 5). En ce qui concerne les 47 protéines sécrétées par la voie non classique indépendante du RE/Golgi, 17 sont régulées après OX1 dont 88,2% (15 sur 17) sont sur-exprim es et 37 sont régulées après OX10 dont 73,0% (27 sur 37) sont sur-exprim es. Seules 6 protéines sur-exprim es après OX1 conservent cette sur-expression après OX10 (Figure R-21B): la protéine ribosomale S30, la protéine TCTP (Translationally-controlled tumor protein), la Calmoduline, la Clathrine (chaîne légère A), RanBP1 et la Thymosine beta-10 (Annexe 5). En outre, 71% (70 sur 98) des protéines dont le taux augmente dans le milieu de culture conditionné après OX10 sont des protéines cens es ne pas être sécrétées (protéines intracellulaires). Ce taux est abaissé à 46% (16 sur 35 protéines) après OX1 (Figure R-21C). Au total, parmi les 194 protéines modul es par OX10, sont compt es autant de protéines sur-exprim es que sous-exprim es (respectivement 98 et 96 protéines). Tandis que 70 protéines possédant un peptide signal diminuent, 70 protéines intracellulaires apparaissent dans le milieu de culture conditionné (Figure R-21B) après traitement par 10  $\mu$ M d'oxaliplatine. Or, le dosage de l'adénylate kinase dans les surnageants de culture démontre que 14,1% ( $\pm$  2,8) de protéines intracellulaires ont contaminé le sécrétome après OX10, c'est-à-dire 2,6 fois plus que pour l'échantillon CTRL.

Par contre, la contamination n'est que de 6,5% ( $\pm 0,4$ ) après OX1, soit seulement 1,2 fois plus élevée que dans l'échantillon CTRL et 2,2 fois moins élevée que dans l'échantillon OX10 (Figure R-19). L'ensemble de ces données suggère que 10  $\mu$ M d'oxaliplatine pendant 72 h est une dose trop cytotoxique si bien que la libération des protéines intracellulaires dans le milieu extracellulaire lors de la mort des cellules entraîne la dilution des protéines réellement sécrétées au risque de fausser la quantification.

Les protéines prédites sécrétées dont la sur-représentation dans le milieu extracellulaire est induite en présence de 1  $\mu$ M d'oxaliplatine sont au nombre de 19 (Annexe 5). Elles se partagent entre 4 portant un peptide signal et 15 sécrétées par la voie non classique indépendante du RE/Golgi. Autant leurs activités biologiques intracellulaires sont plutôt bien décrites, autant leurs fonctions extracellulaires ont peu été explorées (Tableau R-VI). Récemment, une nouvelle approche a été proposée quant à la découverte de biomarqueurs où des voies biologiques plutôt que des protéines individuelles sont ciblées (Sawyers, 2008 ; Lawlor *et al.*, 2009). Notre étude du protéome intracellulaire a permis de mettre en évidence un réseau entre les protéines régulées par l'oxaliplatine et de dégager plusieurs voies biologiques altérées par le médicament au cours du processus de neurotoxicité. Nous avons donc analysé les possibles interactions biologiques entre les 19 protéines sécrétées d'intérêt et ces différentes voies biologiques à l'aide de la base de données STRING (Figure R-23). Il en ressort que 14 intègrent l'interactome, plusieurs d'entre elles au sein du groupe protéique régulant la dynamique du cytosquelette d'actine et le calcium. En particulier, la Thymosine beta-10 et la Calmoduline, sécrétées par la voie non classique indépendante du RE/Golgi, se trouvent être les 2 protéines les plus sur-exprimées au sein du sécrétome OX1 (Annexe 5). Elles font aussi partie des quelques protéines qui restent sur-exprimées dans le sécrétome OX10 (mais d'un facteur moindre).

La Thymosine beta-10 a été identifiée à l'aide de 7 peptides dans le milieu de culture conditionné des cellules SH-SY5Y différenciées traitées pendant 72 h par 1  $\mu$ M d'oxaliplatine. Le taux de la protéine (Figure R-24A) est augmenté d'un facteur 3,78 (2,91-4,94). Notre étude du protéome intracellulaire total des cellules SH-SY5Y selon la méthode iTRAQ-OFFGEL-CL SM/SM a révélé que le traitement par 5  $\mu$ M d'oxaliplatine pendant 24 h induisait aussi la sur-expression intracellulaire de la protéine (Figure R-24A), d'un facteur 1,26 (1,04-1,55).

La Calmoduline a été identifiée à l'aide de 10 peptides. Le taux de la protéine est augmenté d'un facteur 1,90 (1,52-2,36) dans le milieu de culture conditionné des cellules SH-SY5Y différenciées traitées pendant 72 h par 1  $\mu$ M d'oxaliplatine (Figure R-24A). Au contraire, l'étude du protéome intracellulaire a montré la sous-expression de la protéine d'un facteur 0,625 (0,530-0,738) suite au traitement par 50  $\mu$ M d'oxaliplatine pendant 24 h (Figure R-24A).

Une autre protéine sécrétée (possédant un peptide signal en position 1-31) et sur-exprimée a retenu notre attention. La Neudésine a été identifiée dans notre analyse iTRAQ du sécrétome des cellules SH-SY5Y différenciées mais à l'aide d'un peptide unique: GVVFDVTSGKEFYGR (en position 70-84 ; 1948,8786 uma après marquage). Ce peptide a toutefois été identifié dans les 2 réplicats biologiques. La quantification relative par iTRAQ révèle une sur-expression non négligeable, d'un facteur 2,8 (2,1-3,8), de ce peptide au sein du sécrétome digéré après que les cellules ont été traitées par 1  $\mu$ M d'oxaliplatine pendant 72 h (Figure R-25A). Cette sur-expression relative demeure dans le sécrétome OX10 (Figure R-25A) avec un facteur de 2,1 (1,6-2,8). La Neudésine a aussi été identifiée après l'analyse iTRAQ du protéome intracellulaire total des cellules SH-SY5Y. Si 2 peptides, de séquence YPIVGYTAR (en position 137-145) et GVVFDVTSGKEFYGR, ont permis l'identification de la protéine, seul le même peptide GVVFDVTSGKEFYGR est différentiellement exprimé. Ce dernier apparaît significativement sur-exprimé, d'un facteur 1,6 (1,2-2,2) après 24 h de traitement par 50  $\mu$ M d'oxaliplatine (Figure R-25A).

### ***Validation par western-blot***

La Thymosine beta-10 est une toute petite protéine de 5,0 kDa et malgré nos efforts, l'expression de la protéine n'a pu être vérifiée par western-blot.

Des western-blots ont été réalisés à partir des extraits cellulaires et des surnageants de culture des cellules SH-SY5Y cultivées en milieu sans sérum mais avec 1% (v/v) de supplément neurobiologique N2 (voir MATERIELS ET METHODES). La diminution dose-dépendante de l'expression intracellulaire de la Calmoduline sous l'effet de l'oxaliplatine pendant 24 h est observée (Figure R-24B), de même que l'augmentation de l'expression extracellulaire de la protéine après 72 h de traitement par 1  $\mu$ M d'oxaliplatine (Figure R-24B).

L'élévation du taux de la Neudésine induite par l'oxaliplatine (1  $\mu$ M, 72 h) a été confirmée par western-blot (Figure R-25B) à partir des surnageants de culture à la fois des cellules SH-SY5Y différenciées et des cellules SH-SY5Y cultivées en milieu sans sérum mais avec 1% (v/v) de supplément neurobiologique N2. Le western-blot de la protéine révèle la sur-expression dose-dépendante de la Neudésine au sein des cellules SH-SY5Y sous l'effet de l'oxaliplatine pendant 24 h (Figure R-25B).

### ***Analyse préliminaire de l'expression protéique différentielle au sein de ganglions de racine dorsale de rat***

Une étude *in vivo* toute préliminaire a été initiée en collaboration avec le Pr. François Lasbennes (Laboratoire de Neurophysiologie Cellulaire et Intégrée UMR CNRS/ULP 7519, Strasbourg) afin de suivre par western-blot l'expression de la Calmoduline et de la Neudésine au sein de ganglions de racine dorsale de rat. Les animaux ont reçu en intraveineuse 1 dose de 85 mg/m<sup>2</sup> d'oxaliplatine (ou du glucose, pour contrôle) ou 2 doses à 1 semaine d'intervalle. Les prélèvements tissulaires ont été effectués 2 h ou 24 h après le premier traitement ou alors 24 h après le second traitement. Il en ressort la nette sous-expression de la Calmoduline à 2 h post-traitement mais une sur-expression chez les 4 rats traités, 24 h après la perfusion. Le taux de la protéine est abaissé chez l'un des 2 rats traités, 24 h après la seconde perfusion (Figure R-24C). La sur-expression de la Neudésine est observée 2 h après traitement, 24 h après la perfusion chez 2 des 4 rats traités et 24 h après la seconde perfusion chez le rat traité dont l'expression de la Calmoduline dans ses ganglions diminue (Figure R-25C).

## **DISCUSSION**

## DISCUSSION

Nous avons, pour la première fois à notre connaissance, analysé la neurotoxicité du médicament anticancéreux oxaliplatine par une approche protéomique.

Cette étude, à la fois méthodologique et biologique, a été menée dans la perspective d'une application clinique.

### **La complémentarité des approches protéomiques quantitatives**

Une étude protéomique comparative a été conduite afin d'identifier les protéines associées à la souffrance neuronale induite par l'oxaliplatine et d'obtenir une vision plus globale de la pathogénie. Un modèle cellulaire humain de neurotoxicité de l'oxaliplatine a été utilisé, la lignée de neuroblastome SH-SY5Y (Donzelli *et al.*, 2004). Le profil d'expression protéique de cellules non traitées a été comparé à ceux de cellules traitées pendant 24 h, la neuropathie apparaissant précocément chez les patients, par 5  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine, dose correspondant à la concentration maximale moyenne du médicament dans le plasma des patients après 2 h de perfusion à 85  $\text{mg}/\text{m}^2$  (Graham *et al.*, 2000), ou par 2 fois (10  $\mu\text{M}$ ) ou 10 fois cette dose (50  $\mu\text{M}$ ). Deux approches protéomiques quantitatives ont été employées, l'une "top-down", l'autre "bottom-up". Les extraits protéiques totaux de 4 réplicats biologiques ont été, d'une part, séparés par DIGE-2D. Combinée à la spectrométrie de masse, l'analyse a mis en évidence la modulation de 69 protéines par l'oxaliplatine, selon des facteurs d'expression allant de -239% à +310% des taux "contrôle". D'autre part, l'analyse protéomique au niveau peptidique étant devenue une méthode de choix pour les échantillons très complexes, nous avons testé la nouvelle technique de fractionnement des peptides par IEF-OFFGEL après marquage de ces derniers à l'aide de réactifs iTRAQ. Le protocole iTRAQ-OFFGEL-RPLC-SM/SM s'est révélé très efficace pour améliorer la couverture protéomique de la lignée SH-SY5Y. Plus de 700 protéines (avec au moins 2 peptides) ont ainsi pu être identifiées à partir de seulement 400  $\mu\text{g}$  de protéines, dont un certain nombre de protéines faiblement

concentrées. L'amélioration de la séparation par nano-RPLC a ensuite permis d'augmenter le nombre total de protéines identifiées (avec au moins 2 peptides) à plus de 1600 par manipulation. La combinaison des 4 expériences iTRAQ menées à partir des 4 réplicats biologiques a résulté en l'identification de 2774 protéines avec au moins 2 peptides, ce qui, à notre connaissance, représente l'analyse protéomique la plus complète de lignée cellulaire de type neuronal. Dans une étude précédemment reportée du protéome de la lignée SH-SY5Y (Gilany *et al.*, 2008), 1103 protéines avaient pu être identifiées grâce à la combinaison de 4 approches protéomiques différentes (E-2D, MudPIT, GeLC-MS, COFRADIC N-terminal) ayant nécessité 3,8 mg de protéines. Notre analyse protéomique couvre 90% de cette étude. L'analyse iTRAQ des extraits protéiques totaux des cellules non traitées et traitées par l'oxaliplatine a mis en évidence la modulation de 119 protéines par l'oxaliplatine, selon des facteurs d'expression allant de -244% à +214% des taux "contrôle". 21 protéines identifiées comme variantes par DIGE-2D l'ont aussi été après marquage iTRAQ, 98 protéines ont été spécifiquement identifiées comme variantes par approche iTRAQ et 48 protéines ont été spécifiquement identifiées comme variantes par DIGE-2D, 47 d'entre elles présentant un taux constant selon la quantification iTRAQ. De tels résultats contradictoires entre les 2 technologies ont été observés dans d'autres projets (Alvarez *et al.*, 2009) et attribués à l'incapacité de distinguer par la méthode iTRAQ les protéines avec des modifications post-traductionnelles ou encore les isoformes protéiques, tandis que la DIGE-2D permet de fractionner directement les protéines. D'ailleurs, dans notre étude, 15 spots correspondent à des protéines déjà identifiées dans d'autres spots. Les avantages et inconvénients des 2 techniques ont déjà été discutés (Wu *et al.*, 2006, Alvarez *et al.*, 2009). La détection de protéines de pI ou de poids moléculaire extrême ou de protéines hydrophobes est plus limitée par la méthode de séparation par gel (DIGE-2D) que par la méthode de séparation par OFFGEL-RPLC des peptides marqués à l'iTRAQ. Ainsi, tout comme d'autres équipes (Tan *et al.*, 2008 ; Thon *et al.*, 2008 ; Alvarez *et al.*, 2009 ; Bijian *et al.*, 2009 ; Lim *et al.*, 2009 ; VanGuilder *et al.*, 2011), nous notons que la DIGE-2D et l'approche iTRAQ sont des technologies protéomiques quantitatives complémentaires plutôt que redondantes et que la diversité méthodologique contribue à révéler la complexité des systèmes biologiques. Au total, les résultats cumulés obtenus par les 2 approches ont fourni une liste de 167 protéines régulées par l'oxaliplatine de manière dose-dépendante au sein des cellules SH-SY5Y. Une analyse globale, à la fois bioinformatique et bibliographique, de l'ensemble de ces protéines associées à la neurotoxicité de l'oxaliplatine a alors été effectuée afin d'extraire les voies biologiques mises en jeu.

# La caractérisation protéomique de la neurotoxicité de l'oxaliplatine

L'analyse du protéome intracellulaire total des cellules SH-SY5Y met en évidence la régulation par l'oxaliplatine de protéines impliquées dans différentes voies biologiques, permettant ainsi de caractériser les mécanismes moléculaires de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Ces voies concernent 1) la réponse aux dommages à l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire, 2) le stress oxydatif et le métabolisme énergétique, 3) le stress protéotoxique et la résistance multidrogue, 4) la plasticité neuronale et l'homéostasie calcique.

## *L'oxaliplatine régule des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire dans les cellules SH-SY5Y*

La cible de l'oxaliplatine la plus décrite est l'ADN et notre étude révèle plusieurs protéines liées à la réponse aux dommages à l'ADN comme différentiellement exprimées après traitement par l'oxaliplatine des cellules SH-SY5Y (Tableau R-VII). Les protéines HMG-1, HMG-2 et Msh2, connues comme étant impliquées dans la reconnaissance des lésions de l'ADN dues au platine (Chaney *et al.*, 2005) sont sous-exprimées. Certaines protéines du remodelage de la chromatine qui est indispensable à la réparation de l'ADN, se trouvent aussi modulées (Tableau R-VII). En particulier, la protéine promotrice de compaction Histone deacetylase 1 (Schrumpp, 2009) est sous-exprimée.

Quelques facteurs de croissance mitogènes présentent une expression diminuée dans notre étude, comme la protéine neurosécrétoire VGF ou la protéine HDGF (Tableau R-VII). L'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN est un important mécanisme pour la maintenance de l'intégrité génomique. Parmi nos résultats, la Calmoduline est sous-exprimée suite au traitement (Tableau R-VII). Il a été rapporté que la réduction de la concentration intracellulaire de Calmoduline bloquait l'entrée des cellules en mitose (Patel *et al.*, 1999). L'expression de certaines protéines liées à la régulation du cytosquelette, particulièrement durant la mitose, est inhibée par l'oxaliplatine (Tableau R-VII). Il s'agit notamment de la Stathmine qui déstabilise et réorganise le cytosquelette de microtubules au cours de la

progression du cycle cellulaire, régulant ainsi la formation du fuseau mitotique. Associées à l'anneau contractile, les Septines sont des protéines essentielles de la cytokinèse (Silverman-Gavrila *et al.*, 2008). La déplétion des protéines nucléolaires, Nucléophosmine et Nucléoline (Tableau R-VII), altérant l'attachement des chromosomes au fuseau de microtubules, est connue pour bloquer la ségrégation des chromosomes et retarder le déroulement de la mitose (Amin *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2009).

### ***L'oxaliplatine régule des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif et dans le métabolisme énergétique dans les cellules SH-SY5Y***

Dans notre analyse, plusieurs protéines mitochondriales sont différentiellement régulées dans les cellules SH-SY5Y traitées à l'oxaliplatine par rapport aux cellules non traitées (Tableau R-VIII). Les mitochondries sont des organelles particulièrement importants à la fonction neuronale tant les besoins énergétiques des neurones et synapses sont grands (Knott *et al.*, 2008). Quelques enzymes de dégradation des acides gras ainsi que du cycle de Krebs (ou cycle de l'acide tricarboxylique, TCA) apparaissent sous-exprimées (Tableau R-VIII). L'expression de différentes sous-unités de l'ATP synthase (complexe V de la chaîne respiratoire) est aussi modifiée. La protéine mitochondriale MtSSB (Single-stranded DNA-binding protein), composant essentiel de la machinerie de réplication de l'ADN mitochondrial (Longley *et al.*, 2009), est sous-réglée dans cette étude, suggérant que l'oxaliplatine a pu s'accumuler au sein des mitochondries et former des adduits de platine au niveau de l'ADN mitochondrial (Yang *et al.*, 2006) qui code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire (Scarpulla, 2008). En plus de la phosphorylation oxydative (OXPHOS), la voie de la glycolyse (cytoplasmique) semble elle aussi affectée par l'oxaliplatine puisqu'une majorité des enzymes glycolytiques sont déplétées dans notre modèle (Tableau R-VIII). Toutefois la protéine GAPDH est sur-exprimée. Parallèlement à son rôle classiquement décrit dans la glycolyse, la GAPDH a émergé ces dernières années comme un promoteur de l'apoptose (Chuang *et al.*, 2005). L'ensemble de ces observations laisse à penser que dans les cellules SH-SY5Y, l'oxaliplatine est à l'origine d'une perturbation du métabolisme énergétique.

Notre approche met en évidence la variation d'expression de protéines dédiées à détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à limiter les dommages oxydatifs cellulaires (Tableau R-VIII). Plusieurs protéines anti-oxydantes thiorédoxine-dépendantes, participant à

la maintenance d'un environnement intracellulaire réducteur, sont ainsi régulées (Tableau R-VIII). Ces protéines jouent un rôle crucial puisqu'elles protègent le protéome des attaques par les ROS par réaction d'échange thiol/disulfure au niveau des cystéines (Montrichard *et al.*, 2009). La protéine AIF-1 (Apoptosis-inducing factor 1) ressort sous-exprimée de cette étude (Tableau R-VIII). La protéine est connue pour être relarguée de la mitochondrie sous l'influence d'un signal apoptogène afin de stimuler la voie apoptotique indépendante des caspases. Liée à l'ADN, AIF-1 conduit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Susin *et al.*, 1999). Cependant un rôle opposé dans la survie cellulaire a été mis en évidence. AIF-1 possède aussi séparément une activité NADH-oxydase (Miramar *et al.*, 2001), qui est antiapoptotique (Lipton *et al.*, 2002). Les souris Harlequin dont le gène *AIFM1* est muté possèdent des neurones plus sensibles aux peroxydes (Klein *et al.*, 2002), ce qui démontre l'implication de l'activité oxydo-réductrice d'AIF-1 dans le piégeage des radicaux libres (Reix *et al.*, 2007).

La Prohibitine est sur-exprimée par l'oxaliplatine dans les cellules SH-SY5Y (Tableau R-VIII). En dehors de son rôle de chaperon mitochondrial, la prohibitine a été connectée à des fonctions cellulaires variées, notamment dans le noyau comme régulateur transcriptionnel (Mishra *et al.*, 2006) et en particulier comme activateur de la transcription d'un certain nombre de gènes antioxydants au cours du stress oxydatif (Theiss *et al.*, 2009, Nguyen *et al.*, 2009), soutenant l'action protectrice de la prohibitine contre les dommages oxydatifs (Liu *et al.*, 2009).

### ***L'oxaliplatine régule des protéines impliquées dans la réponse au stress protéotoxique et dans la résistance multidrogue dans les cellules SH-SY5Y***

Les résultats cumulés obtenus par les 2 approches DIGE-2D et iTRAQ révèlent la régulation de protéines en lien avec le stress du réticulum endoplasmique ou stress du RE (Tableau R-IX). Il est intéressant d'observer dans les cellules SH-SY5Y que l'oxaliplatine régule les 2 protéines chaperones majeures du RE, à savoir grp78/BiP et l'Endoplasmine (grp94). Celles-ci assistent le repliement et l'assemblage des protéines afin de prévenir leur aggrégation, protégeant ainsi les cellules contre le stress du RE (Kim *et al.*, 2008). Ces 2 protéines sont les seules de notre étude à être différemment quantifiées par nos 2 approches protéomiques en fonction de la dose d'oxaliplatine. Si grp78/BiP et l'endoplasmine apparaissent sur-exprimées

après 50  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine selon l'approche iTRAQ, les 2 protéines sont sous-exprimées après 10  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine selon l'approche DIGE-2D. La baisse du taux de la protéine grp78/BiP a été associée à une hypersensibilité aux agents endommageant l'ADN (Zhai *et al.*, 2005, Pyrko *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2008). D'autres acteurs de la maturation des protéines sont différenciellement exprimés (Tableau R-IX) comme la disulfide-isomérase ERp60. En outre, la protéine VCP/p97 (Zhong *et al.*, 2006) est réprimée par l'oxaliplatine dans notre analyse (Tableau R-IX). Cette chaperone fait partie du mécanisme de contrôle qualité des protéines appelé ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation), qui via la rétrotranslocation du RE vers le cytosol, cible les protéines mal repliées vers le système de catabolisme ubiquitine-protéasome (Raasi *et al.*, 2007). L'expression d'une sous-unité du Protéasome 26S est ici augmentée (Tableau R-IX). A l'intérieur des cellules, les sels de platine peuvent directement endommager les protéines, qu'elles soient solubles, membranaires ou du cytosquelette, en formant des adduits de platine avec les acides aminés nucléophiles tels que les résidus cystéine, méthionine et histidine (Gonias *et al.*, 1984, Gonzalez *et al.*, 2001). La "platination" des protéines, qui se produit quand les résidus réactifs sont accessibles, soit à priori au cours de la traduction, gêne alors le repliement des protéines essentiel à l'acquisition de leur conformation fonctionnelle. La cytotoxicité de l'oxaliplatine médiée par le stress du RE n'a, à notre connaissance, pas été explorée jusque là dans un modèle neuronal. Toutefois, le stress du RE est un dénominateur commun bien connu des maladies neurodégénératives, qui sont caractérisées par l'accumulation dans les neurones d'agrégats protéiques toxiques (Paschen *et al.*, 2005).

Des protéines de la machinerie traductionnelle sont régulées dans notre modèle de neurotoxicité de l'oxaliplatine (Tableau R-IX). Notamment la Bystine et la Nucléoline, impliquées dans l'assemblage des ribosomes et le traitement des ARN ribosomiques (Miyoshi *et al.*, 2007, Ginisty *et al.*, 1999) ainsi que plusieurs protéines ribosomales (Tableau R-IX) se trouvent sous-exprimées. Burger *et al.* (2010) ont récemment démontré que l'inhibition de la biogénèse des ribosomes par un large panel de chimiothérapies pouvait contribuer à la cytotoxicité des traitements anticancéreux. Une autre protéine ribosomale (40S ribosomal protein SA) encore appelée MGr1-Ag (Multidrug resistance-associated protein) est sous-exprimée en présence d'oxaliplatine dans les cellules SH-SY5Y (Tableau R-IX). Or, il a été montré que la sur-expression de cette protéine jouait un rôle dans la résistance multidrogue vis-à-vis des agents anticancéreux 5-fluorouracil, vincristine et adriamycine dans les cellules

de cancer gastrique (Shi *et al.*, 2002), ceci via le blocage de l'accumulation intracellulaire des médicaments et l'inhibition de l'apoptose (Sun *et al.*, 2006).

### ***L'oxaliplatine régule des protéines impliquées dans la plasticité neuronale et dans l'homéostasie calcique dans les cellules SH-SY5Y***

Il apparaît dans notre analyse que l'oxaliplatine perturbe le cytosquelette dans les cellules SH-SY5Y (Tableau R-X). La Tubuline- $\beta$ , impliquée dans la cytotoxicité des agents anticancéreux antimicrotubules neurotoxiques tels que les vinca-alcaloïdes, taxanes ou épothilones (Wolf *et al.*, 2008), est ici sur-exprimée. De plus, considérant l'importance de la Stathmine et des protéines MAP (Microtubule-Associated Proteins) dans la dynamique des microtubules, nous proposons que la sous-expression de ces protéines puisse sensibiliser les cellules SH-SY5Y à l'oxaliplatine. En effet, le réseau très organisé de microtubules, assurant le transport axonal des organites, enzymes, métabolites est indispensable à la fonction neuronale (Conde *et al.*, 2009). En outre, les modifications morphologiques accompagnées par le réarrangement du cytosquelette sont considérées comme une marque d'apoptose cellulaire (Ndozangue-Tourigine *et al.*, 2008). Les marqueurs synaptiques, Synaptopodine-2, Neuromoduline et N-CAM1 (Neural cell adhesion molecule 1) voient aussi leur expression diminuée par l'oxaliplatine (Tableau R-X).

De manière intéressante, notre étude protéomique révèle la déplétion de plusieurs protéines à l'interface entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique (Tableau R-X). Les 3 protéines ERM, l'Ezrine, la Radixine et la Moésine, particulièrement concentrées dans certaines structures spécialisées de la surface cellulaire telles que les microvilli, les jonctions intercellulaires, les filopodes, servent de liens entre une variété de protéines transmembranaires et les filaments d'actine, régulant ainsi l'interaction dynamique entre la membrane plasmique et le cytosquelette (Turunen *et al.*, 1994, Fehon *et al.*, 2010). De même, les Spectrines  $\alpha$  et  $\beta$  sont sous-exprimées (Tableau R-X). Présentes dans la plupart des cellules, dont les neurones, ces protéines relient le cytosquelette d'actine aux protéines membranaires incluant les canaux Nav et de nombreux échangeurs et pompes ioniques, limitant ainsi leur diffusion (Susuki *et al.*, 2008). Le niveau d'expression de la protéine AHNAK se trouve aussi abaissé (Tableau R-X). Cette dernière possède un domaine PDZ

permettant l'ancrage des canaux calciques à la membrane et au cytosquelette d'actine dans différents types cellulaires (Shao *et al.*, 2009, Komuro *et al.*, 2004).

Nous avons détecté comme variantes d'autres protéines impliquées dans l'homéostasie calcique (Tableau R-X). L'oxaliplatine affecte l'expression de 2 protéines associées aux rafts lipidiques membranaires, l'Annexine II et la Protéine S100-A10 qui fonctionnent comme des senseurs des fluctuations intracellulaires en calcium (Monastyrskaya *et al.*, 2007). La Calmoduline apparaît sous-exprimée (Tableau R-X) or cette protéine a un rôle majeur dans la transduction du signal calcique dans la cellule et en particulier dans la cellule neuronale (Lukas *et al.*, 1988, Marambaud *et al.*, 2009). D'autres protéines liant le calcium sont régulées (Tableau R-X) comme grp78/BiP, l'Endoplasmine ou Aralar2.

## **Le sécrétome d'une lignée de neuroblastome humain différenciée, un modèle pour la découverte de biomarqueurs de la neurotoxicité de l'oxaliplatine**

La découverte de biomarqueurs protéiques circulants de la neurotoxicité de l'oxaliplatine permettrait de discriminer les patients prédisposés à développer une neuropathie périphérique indésirable. L'immense complexité du protéome plasmatique limite son utilisation pour la découverte de tels biomarqueurs. Le sous-protéome des protéines sécrétées spécifiquement par notre modèle cellulaire de neurotoxicité sous l'effet de l'oxaliplatine a donc été analysé. Ces protéines pourraient être sécrétées *in vivo* par les neurones périphériques, passer dans la circulation sanguine des patients et prédire le développement d'une neuropathie.

L'analyse protéomique des surnageants de culture des cellules SH-SY5Y a nécessité la mise au point de conditions de culture adaptées, afin de limiter leur contamination par des protéines intracellulaires ou exogènes. L'absence de sérum animal dans le milieu perturbant fortement

la viabilité de la lignée cellulaire, des protocoles alternatifs ont été testés. Le supplément neurobiologique N2 recommandé pour la culture sélective des neurones post-mitotiques et lignées cellulaires de phénotype neuronal s'est avéré trop riche en protéines pour une approche protéomique. Le protocole décrit par Encinas *et al.* (2000) permet de maintenir en culture les cellules SH-SY5Y dans un milieu dépourvu de sérum, en différenciant les cellules. Les cellules SH-SY5Y ont donc été traitées séquentiellement par l'acide rétinoïque, qui induit l'expression du récepteur de neurotrophines TrkB (Tyrosine receptor kinase B) puis par la neurotrophine BDNF, qui promeut la survie et la différenciation neuronale (Kaplan *et al.*, 1993). Le protocole a été optimisé pour notre étude. La densité d'ensemencement des cellules, le volume de milieu et le type de flacons de culture ont été déterminés en suivant la viabilité cellulaire. Outre l'intérêt technique de leur indépendance vis-à-vis du sérum, les cellules SH-SY5Y différenciées offrent un modèle neuronal plus physiologique (Encinas *et al.*, 2000 ; Gimenez-Cassina *et al.*, 2006).

Le sécrétome de cellules différenciées non traitées a été comparé à ceux de cellules différenciées puis traitées par 1  $\mu\text{M}$  ou 10  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine pendant une durée de 72 h favorisant l'enrichissement des surnageants de culture en protéines sécrétées. Les milieux de culture conditionnés de 2 réplicats biologiques ont été filtrés, concentrés 200 fois puis analysés par la méthode iTRAQ-OFFGEL-RPLC-SM/SM. La dose de 10  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine pendant 72 h s'est avérée trop cytotoxique, à l'origine d'une contamination importante des surnageants de culture par des protéines intracellulaires lors de la lyse des cellules. La modulation par 1  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine de 48 protéines identifiées avec au moins 2 peptides a été mise en évidence, selon des facteurs d'expression allant de -206% à +378% des taux "contrôle". Selon les données bioinformatiques, le sécrétome altéré par 1  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine se trouve enrichi à 54% (26 protéines sur 48) de protéines susceptibles d'être sécrétées. Dans le protéome humain, la proportion des protéines extracellulaires a été estimée à 8% selon Anderson *et al.* (2004).

Nous nous sommes concentrés sur les protéines sécrétées et sur-exprimées. 19 protéines identifiées avec au moins 2 peptides et prédites sécrétées voient leur taux augmenté au sein du sécrétome des cellules différenciées et traitées par 1  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine. Afin de ne pas écarter les protéines de plus bas poids moléculaire ( $\leq 30$  kDa), générant peu de peptides tryptiques, nous avons aussi considéré les 4 protéines prédites sécrétées, identifiées dans les 2 réplicats biologiques à l'aide d'un peptide unique significativement sur-exprimé suite au traitement par 1  $\mu\text{M}$  d'oxaliplatine (Annexe 7). Il s'agit des protéines de fonction indéterminée FAM107B et

FAM136A, de la Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (isoforme 2) et de la Neudésine. Parmi ces 23 candidats biomarqueurs, les protéines les plus fortement modulées sous l'effet de l'oxaliplatine ont été pré-sélectionnées. 20 protéines présentent une expression augmentée d'un facteur compris entre 1,14 et 1,60 tandis que 3 protéines sont sur-exprimées d'un facteur compris entre 1,90 et 3,78: la Calmoduline (1,90), la Neudésine (2,80) et la Thymosine beta-10 (3,78).

Les western-blots réalisés à partir des surnageants de culture des cellules SH-SY5Y ont confirmé l'élévation du taux extracellulaire des protéines Calmoduline et Neudésine sous l'effet de l'oxaliplatine. La Thymosine beta-10 n'a pu être testée.

Des western-blots ont aussi été réalisés à partir de ganglions de racine dorsale de rats traités ou non par l'oxaliplatine. La Neudésine se trouve sur-exprimée *in vivo* chez certains animaux 2 h et 24 h après le traitement ainsi qu'après 2 injections d'oxaliplatine à 1 semaine d'intervalle. En revanche, le taux de la Calmoduline chute brutalement 2 h après l'injection, tout comme au sein des cellules SH-SY5Y 24 h après traitement, puis remonte. La protéine est ainsi sur-exprimée dans les ganglions 24 h après l'injection. Des tests mécaniques de nociception pré- et post-injection ont été effectués sur les animaux dont les ganglions ont été prélevés mais les résultats sont inexploitable. Ainsi les niveaux d'expression des protéines ne peuvent être interprétés en regard de la réaction des rats au traitement.

La Thymosine beta-10 et la Calmoduline ont été associées à la neurotoxicité de l'oxaliplatine dans notre analyse de l'effet du médicament sur le protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y. Nous avons montré que l'oxaliplatine régulait des protéines impliquées dans la plasticité neuronale et dans l'homéostasie calcique. La Thymosine beta-10, en séquestrant les monomères d'actine (Mannherz *et al.*, 2009), est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine. La Calmoduline joue un rôle essentiel dans l'homéostasie calcique. Les fonctions extracellulaires des deux protéines, qui ne possèdent pas de peptide signal, sont moins bien décrites. Les thymosines-beta pourraient exercer une activité neuroprotectrice intra- et extracellulaire, respectivement via la promotion de la régénération neuronale et la prévention de l'apoptose neuronale (Sun and Kim, 2007). La Calmoduline extracellulaire pourrait stimuler la prolifération des cellules (WenQiang *et al.*, 1997). La Neudésine, quant à elle, est sécrétée à l'aide d'un peptide signal. La protéine a récemment été décrite comme un facteur neurotrophique (Kimura *et al.*, 2005).

## La Neudésine, candidat biomarqueur de la neurotoxicité de l'oxaliplatine

Au cours de la phase de découverte de biomarqueurs, il est d'un intérêt particulier de sélectionner des candidats présentant une spécificité tissulaire. Dans notre analyse protéomique, la Neudésine (accession: Q9UMX5|NENF\_HUMAN) s'est trouvée régulée à la fois dans le sécrétome et le protéome intracellulaire total des cellules SH-SY5Y. La Neudésine est une protéine sécrétée à l'aide d'un peptide signal qui a récemment été identifiée par Kimura *et al.* (2005) chez la souris, chez l'Homme (~90% d'identité) puis spécifiquement chez les vertébrés. Abondamment exprimée chez la souris dans les neurones du cerveau en développement et du cordon de la moelle épinière de l'embryon ainsi que dans les neurones du cerveau adulte, la Neudésine présente une forte activité neurotrophique, d'où son nom (Neudesin: neuron-derived neurotrophic secreted protein, Kimura *et al.*, 2005). Cette protéine a été ici quantifiée par approche iTRAQ mais à l'aide d'un peptide unique, de séquence GVVFDVTSKGKEFYGR (présentant un site de clivage trypsique manqué), significativement sur-exprimé suite au traitement des cellules par l'oxaliplatine. Il se trouve que la Neudésine humaine est une petite protéine de 18,8 kDa (15,7 kDa sans le peptide signal) composée de 172 acides aminés (141 sans le peptide signal) qui ne génère potentiellement que 10 peptides trypsiques de plus de 800 Da (9 sans le peptide signal). Toutefois, ce seul peptide est constitué d'une longue séquence de 15 acides aminés, unique chez *Homo sapiens*, ce qui en fait une signature spécifique de la protéine. De plus, de pI = 6,07, le peptide a été validé par son isolement dans la fraction OFFGEL correspondante (F10-F11). Aussi avons-nous entrepris de vérifier l'expression de la protéine à l'aide de 2 anticorps spécifiques différents (voir MATERIELS ET METHODES). Les western-blots réalisés à partir des extraits cellulaires totaux et des milieux conditionnés ont permis de valider la sur-expression induite par l'oxaliplatine de la Neudésine à la fois intra- et extra-cellulaire. La Neudésine pourrait-elle être liée aux voies biologiques impliquées dans le processus de neurotoxicité de l'oxaliplatine?

La Neudésine a fait l'objet d'un nombre très restreint de publications, aussi peu de données sur la protéine sont disponibles. Aucune interaction biologique n'a été révélée à l'aide de la base de données STRING entre la Neudésine et notre réseau de protéines intracellulaires régulées par l'oxaliplatine (Figure R-23). Kimura *et al.* (2005) ont présenté la Neudésine

comme un facteur neurotrophique jouant un rôle dans la maintenance et la protection des neurones par voie autocrine ou paracrine. Ils ont produit la protéine recombinante qu'ils ont ajoutée au milieu sans sérum de neurones murins en culture primaire et ont montré par immuno-marquage de la protéine MAP2 (Microtubule-associated protein 2) que la Neudésine améliorait la survie des neurones de manière dose-dépendante (1-100 pg/mL). Dans notre étude, le taux de la Neudésine intra- et extra-cellulaire est augmenté suite au traitement des cellules SH-SY5Y par l'oxaliplatine. La Neudésine pourrait ainsi protéger les neurones de l'effet délétère de l'oxaliplatine. Kimura *et al.* (2005) ont aussi mis en évidence à partir d'extraits protéiques de neurones murins en culture primaire que la Neudésine recombinante induisait la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt et que l'activité neurotrophique de la Neudésine était médiée par l'activation de la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) et de la voie PI-3K/Akt (Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt). De plus, il a été montré que l'inhibition de la Neudésine endogène par ARN interférence diminuait la viabilité de la lignée cellulaire murine de neuroblastome Neuro2a et supprimait dans ces cellules la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt (Kimura *et al.*, 2008). Le récepteur de la Neudésine n'a pas été identifié mais les auteurs, par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, ont proposé que la Neudésine interagisse avec un récepteur couplé aux protéines G (Kimura *et al.*, 2005). Très récemment, la voie des MAPKs a été impliquée dans le processus de neurotoxicité des sels de platine. Scuteri *et al.* (2009) ont montré *in vitro* que l'oxaliplatine induisait l'apoptose des neurones de ganglions de racine dorsale par un mécanisme impliquant l'activation (la phosphorylation) précoce de p38 et d'ERK1/2 mais aussi la sous-activation de JNK/Sapk (NH2-terminal c-Jun Kinase/Stress Activated Protein Kinase), suggérant un rôle neuroprotecteur de JNK/Sapk. Puis, Scuteri *et al.* (2010) ont démontré que la neurotrophine NGF (Nerve Growth Factor) protégeait les neurones ganglionnaires de l'apoptose induite par l'oxaliplatine en restaurant la phosphorylation de JNK/Sapk et d'ERK1/2, inhibée par l'exposition prolongée à l'oxaliplatine, et en réduisant partiellement l'activation de p38. Aussi, la Neudésine sécrétée pourrait-elle moduler dans les neurones la voie des MAPKs altérée par le traitement à l'oxaliplatine? Cette modulation aurait-elle une action neuroprotectrice en termes de survie et de maintien de la différenciation des cellules neuronales vis-à-vis du médicament? Nous avons ainsi envisagé qu'un polymorphisme génétique puisse être identifié dans le gène *NENF*, que des mutations puissent altérer l'activité neuroprotectrice de la Neudésine et être reliées à la prédisposition de certains patients à développer des neuropathies périphériques induites par l'oxaliplatine.

Kimura *et al.* (2008) ont étudié les propriétés moléculaires de la Neudésine. Ils ont ainsi observé que la Neudésine possédait dans sa structure primaire un domaine de liaison à l'hème similaire à celui du cytochrome *b<sub>5</sub>*. La Neudésine appartient à la famille MAPR (Membrane-Associated Progesterone Receptor) tout comme la protéine membranaire PGRMC1 (Progesterone receptor membrane component 1) mais ne lie pas les stéroïdes. Kimura *et al.* (2008) ont produit un mutant protéique sans domaine de liaison à l'hème incapable de se lier à l'hémine exogène contrairement à la Neudésine recombinante. Ils ont démontré que la Neudésine recombinante associée *in vitro* à de l'hémine puis ajoutée au milieu augmentait davantage la survie des cellules Neuro2a et de neurones murins en culture primaire que la Neudésine recombinante seule. De même, la Neudésine liée à l'hémine activait davantage ERK1/2 et Akt dans ces cellules. Au contraire, la Neudésine mutante (ni l'hémine seule) n'avait aucun impact sur les cellules neuronales et n'induisait pas la phosphorylation d'ERK1/2 et d'Akt. Les auteurs ont pu vérifier par chromatographie sur colonne d'affinité contenant des billes d'agarose-hémine que la Neudésine endogène sécrétée dans le surnageant de culture des cellules Neuro2a contenait de l'hème, la protéine n'étant pas retenue sur la colonne. Ainsi, Kimura *et al.* (2008) ont montré que l'activité neurotrophique de la Neudésine dépendait de la liaison de l'hémine (hème sous forme oxydée) [Fe(III)-protoporphyrine IX] à la protéine. L'hème est un groupement prosthétique intervenant dans de nombreuses réactions biochimiques, en particulier dans les réactions d'oxydo-réduction. L'hème intracellulaire en excès est hautement toxique, capable de médier un stress oxydatif contribuant notamment aux processus neurodégénératifs (Kumar and Bandyopadhyay, 2005 ; Jazwa and Cuadrado, 2010). La concentration intracellulaire de l'hème libre est donc très contrôlée. Une fraction importante est ainsi incorporée dans les hémoprotéines telles entre autres l'hémoglobine, la myoglobine, les cytochromes, les oxydases, les catalases. De récentes études ont montré que l'hème pouvait aussi agir comme un messager en modulant la fonction de certaines protéines par sa liaison réversible (Hou *et al.*, 2006). Dans notre étude, le taux de la Neudésine extracellulaire est augmenté suite au traitement des cellules SH-SY5Y par l'oxaliplatine. Serait-il possible que la Neudésine sécrétée puisse piéger l'hème libéré par les cellules lysées alentour sous l'effet du médicament, l'augmentation de la concentration de l'hème extracellulaire pouvant en retour augmenter la concentration de l'hème intracellulaire (probablement par diffusion passive à travers la membrane plasmique liée à la nature lipophile de l'hème, Letarte *et al.*, 1993)? Jusqu'alors l'hémopexine circulante était la seule hémoprotéine extracellulaire connue. La Neudésine est la première protéine extracellulaire se liant à l'hème capable par elle-même de transduire le signal (Kimura *et al.*, 2008). Dernièrement, l'équipe de Kimura a

identifié chez la souris une nouvelle protéine extracellulaire se liant à l'hème qui promeut la neurogénèse, la Neuferricine (Kimura *et al.*, 2010).

La corrélation entre l'expression de la Neudésine et la sensibilité aux traitements génotoxiques n'a pas été étudiée. Toutefois, il a été montré que la sur-expression de la protéine PGRMC1, l'autre membre de la famille MAPR, augmentait la résistance des cellules tumorales à divers médicaments anticancéreux (Rohe *et al.*, 2009). La liaison à l'hème de Dap1, l'homologue de PGRMC1 chez la levure, permettant la régulation d'une protéine P450 probablement impliquée dans l'inactivation des xénobiotiques, s'est avérée essentielle à la résistance aux agents alkylants (Mallory *et al.*, 2005). La Neudésine pourrait-elle exercer des fonctions régulatrices intracellulaires médiées par sa liaison à l'hème?

Mandal *et al.* (2004) ont démontré que l'hème pouvait être une cible directe des sels de platine. Le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine interagissent avec l'hémoglobine au sein des érythrocytes où ils s'accumulent et entraînent la dissociation de l'hème. Ce phénomène peut-il être généralisé à toutes les hémoprotéines cellulaires et fournir un nouveau mécanisme de cytotoxicité/neurotoxicité de l'oxaliplatine? En particulier, nous nous sommes demandés si la Neudésine pouvait être une cible directe de l'oxaliplatine et si le médicament pouvait bloquer la liaison de la Neudésine à l'hème, essentielle à l'activité neuroprotectrice de la protéine. Autrement dit, la neurotoxicité de l'oxaliplatine pourrait-elle être liée à l'inactivation de la Neudésine par le médicament lui-même? Deux hémoprotéines modèles, l'hémoglobine et la myoglobine, ont été utilisées. Les protéines (5 µg) ont été incubées en présence d'hémine, avec ou sans oxaliplatine, séparées en conditions non réductrices par SDS-PAGE, puis électrotransférées sur membrane de PVDF. La présence de l'hème a été révélée par la mise à profit de son activité peroxydase en faisant réagir la membrane dans une solution de Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), substrat luminescent, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bonfils *et al.*, 1995). Les protéines seules n'ont pas été détectées contrairement aux protéines liées à l'hémine. Le signal s'est trouvé grandement diminué du fait de la présence d'oxaliplatine dans les solutions hémoglobine-hémine et myoglobine-hémine. Des gammes de concentrations de l'hémine (de 5 à 50 µM) et de l'oxaliplatine (de 200 µM à 2 mM) ont été réalisées et de très bons résultats ont été obtenus lorsque 5 µg de protéine étaient incubés avec 5 µM d'hémine et 200 µM d'oxaliplatine. Ces tests suggèrent que l'interférence de la liaison de la Neudésine à l'hème causée par l'oxaliplatine puisse être étudiée par cette approche, à condition de disposer de la protéine purifiée en quantité suffisante. D'autre part, la mise en évidence de l'interaction directe de l'oxaliplatine avec

l'hémoglobine et la myoglobine a été abordée par spectrométrie de masse, profitant de la présence du métal Pt dans la structure chimique du médicament. Le protocole de dosage du platine dans les tissus humains proposé par Minakata *et al.* (2006) a été testé. Après séparation par SDS-PAGE en conditions non réductrices des protéines incubées en présence d'hémine, avec ou sans oxaliplatine, les bandes de gel ont été prélevées puis mises dans l'acide nitrique concentré. Le platine a ensuite réagi avec le diethyldithiocarbamate (DDC) et les complexes Pt-DDC extraits par l'isoamylalcohol à pH 3-7 ont été analysés par MALDI-TOF. Les premiers résultats à partir de l'hémoglobine et de la myoglobine semblaient prometteurs.

Dans notre étude, le taux de la Neudésine est augmenté suite au traitement des cellules SH-SY5Y par l'oxaliplatine. Nous avons vu que la Neudésine était une protéine sécrétée, particulièrement exprimée dans le tissu nerveux (quoiqu'aussi dans d'autres tissus sains, selon l'HPA, Human Protein Atlas, <http://www.proteinatlas.org/>) et probablement liée aux voies biologiques impliquées dans le processus de neurotoxicité de l'oxaliplatine. De plus, la Neudésine a déjà été détectée dans le plasma sanguin humain, faisant partie des 3020 protéines de la base PPP (Plasma Proteome Project ; Omenn *et al.*, 2005) de l'HUPO. Nous proposons donc pour la première fois la Neudésine comme candidat biomarqueur de la neurotoxicité des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine.

## Conclusion et perspectives

Nous avons mis en place 2 approches protéomiques complémentaires permettant la quantification relative des protéines par DIGE-2D et des peptides (protéines) par iTRAQ. Le protocole iTRAQ-OFFGEL-RPLC-SM/SM, adapté à l'analyse approfondie de protéomes complexes variés (plasma sanguin, surnageants de culture, cellules et tissus), est devenu le protocole standard utilisé au laboratoire.

Le protéome intracellulaire et le sécrétome du modèle cellulaire SH-SY5Y de neurotoxicité de l'oxaliplatine ont été analysés. Les résultats ont des implications à la fois dans la compréhension de la pathogenèse, grâce à la mise en évidence d'une signature protéique fonctionnelle de l'effet neurotoxique de l'oxaliplatine, et dans le développement pré-clinique de biomarqueurs. Ils font l'objet d'une publication en préparation.

Nous proposons pour la première fois les protéines Calmoduline, Thymosine beta-10 et le facteur neurotrophique Neudésine comme candidats biomarqueurs de la toxicité neurologique des traitements anticancéreux à base d'oxaliplatine.

Le Projet Hospitalier de Recherche Clinique NEUROTOXALI intitulé "Caractérisation et recherche de marqueurs prédictifs de neurotoxicité au cours des traitements par oxaliplatine dans les carcinomes colorectaux: approche génétique et protéomique (Essai de phase II multicentrique)" dont le CRLCC Paul Papin est le centre promoteur, prévoit l'inclusion de 206 patients recevant de l'oxaliplatine toutes les 2 semaines dans le cadre d'un protocole de chimiothérapie de type Folfox. Des échantillons plasmatiques sont collectés, selon un protocole standardisé, avant le début du traitement (prélèvements H0), à chaque cycle, puis 1 mois, 3 mois, 6 mois et 12 mois après la fin du traitement. Dans un avenir proche, des dosages de nos candidats biomarqueurs de la neurotoxicité de l'oxaliplatine pourront donc être réalisés chez un grand nombre de patients traités, puis les résultats analysés à la lumière des dossiers médicaux. La valeur prédictive des protéines pourra être évaluée à partir des prélèvements H0 et un suivi du taux plasmatique des candidats au fur et à mesure des cycles pourra être effectué pour chaque patient. Des kits ELISA permettant le dosage de la Calmoduline, de la Thymosine beta-10 et de la Neudésine dans le plasma humain ont récemment été développés par la société Usen Life Science Inc. (Wuhan, Chine).

## **Annexes**

## **OFFGEL-Isoelectric focusing fractionation for the analysis of complex proteome**

**Emilie Ernoult and Catherine Guette**

### **1. Introduction**

Face to the high complexity and large dynamic range of proteomics samples, efficient and reproducible separation has become an essential step in the strategies to analyze such samples. In a typical proteomics experiment, a sample of interest is separated either at the protein level or at the peptide level after enzymatic digestion of the proteins, followed by protein identification by mass spectrometry (MS).

Isoelectric focusing (IEF) is a high-resolution electrophoretic technique used to separate and concentrate amphoteric biomolecules at their isoelectric point (pI) in a pH gradient and under the application of an electric field. In comparison with other electrophoretic separation techniques, isoelectric focusing (IEF) offers the highest resolution, due to the inherent nature of the focusing process: it is a dynamic process resulting from the constant equilibrium between diffusion and migration. IEF thus is useful for preparative or semi-preparative purposes.

In the context of the evolution of gel-based separations towards gel-free strategies, many techniques have recently been introduced to allow the fractionation of proteins and peptides in solution, such as continuous Free Flow Electrophoresis (see also chapter 3) (**1**), Rotofor (**2**), multicompartement electrolyzers (MCE) (**3**, **4**) and Off-gel electrophoresis (OFFGEL, OGE) which was first described by Ros *et al.* (**5**), as a free-flow technique to purify proteins according to pI and to isolate the protein fraction of interest, in a one-chamber device. The techniques was later adapted to a more versatile multicompartement format, in order to recover fractions of well-defined pI values at the end of the separation, and submit them to further analysis or detection (**6**). The particular advantages of multicompartement OFFGEL-IEF are:

(i) the low volumes used (100–300  $\mu\text{L}$  per compartment), positioning it as a semi-preparative device, useful for prefractionation purposes, but also for analytical uses, and (ii) the direct recovery of liquid fractions, making it fit elegantly into the usual LC-MS workflow (7). This technique was demonstrated to be of great interest in shotgun proteomics (8). IEF is not only a high resolution and high capacity separation method for peptides, it also provides additional physicochemical information like their isoelectric point (9, 10). The pI value provided is used as an independent validating and filtering tool during database search for MS/MS peptide sequence identification (11). Recently, investigations showed the compatibility between OFFGEL technology and iTRAQ quantitation methods (12-14). As we recently demonstrated that iTRAQ reagent by itself favors the MALDI ionization of peptides and that peptide OFFGEL fractionation after iTRAQ labelling improves proteome coverage (14, 15), we propose here a detailed protocol for the analysis of complex proteomes.

## 2. Materials

The reagents and the equipment used in each step of the protocol are listed below. All solutions must be prepared using high quality ultrapure water, Milli-Q water (Millipore) or equivalent (minimum 18.2  $\text{M}\Omega/\text{cm}$ ).

### 2.1. Protein sample(s)

Protein sample(s) from various sources, e.g. from nervous tissue or neuronal cell culture, extracted on ice using a denaturant lysis buffer containing a protease inhibitor cocktail after extensive washing with Phosphate Buffered Saline (PBS). Typical lysis buffer is 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, aliquoted and conserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  but others can be used (*see Note 1* and *Note 2*). Sonication can help for lysis achievement and DNA-bound proteins recovery (*see Note 3*). Protein extract(s) must be kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ , or at  $-20^{\circ}\text{C}$  for very short-term and can be aliquoted for a better storage.

### 2.2. Trypsin digestion

1. 100% acetone stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  at least 30 min before use in a polypropylene plastic tube.
2. Digestion buffer, used when iTRAQ labelling is not later necessary: 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8, aliquoted and conserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  ; or iTRAQ labelling compatible

digestion buffer: triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB) 1.0 M, pH 8.5 (cat. no. T7408, Sigma-Aldrich) diluted to 0.5 M and conserved at +4°C.

3. Protein quantification kit: FluoroProfile Protein Quantification Kit (cat. no. FP0010, Sigma-Aldrich) or 2-D Quant Kit (cat. no. 80-6483-56, GE Healthcare) and Protein Standard (cat. no. P5619, Sigma-Aldrich). Comparable quantification kits from other suppliers should also be effective but their compatibility with digestion buffer must be tested.

4. Reducing reagent: tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, provided in the iTRAQ Reagents Multiplex Kit or cat. no. C4706, Sigma-Aldrich), prepared as a 50 mM stock solution conserved at -20°C.

5. Cysteine-blocking reagent: methyl methanethiosulfonate (MMTS, provided in the iTRAQ Reagents Multiplex Kit or cat. no. 64306, Sigma-Aldrich), prepared as a 200 mM stock solution in isopropanol conserved at -20°C.

6. Trypsin (Trypsin, 25 µg with CaCl<sub>2</sub>, TPCK treated to inactivate extraneous chymotryptic activity, cat. no. 4352157, Applied Biosystems) conserved at -20°C. Trypsin for proteomic analysis from other suppliers should also be effective but must be tested.

7. Heating block or water bath, 60 °C and 37°C.

### ***2.3. iTRAQ labelling, optional***

1. iTRAQ Reagents Multiplex Kit (cat. no. 4352135, Applied Biosystems) or iTRAQ Reagents 8Plex Multiplex Kit (cat. no. 4390812, Applied Biosystems) conserved at -20°C.

2. Precision pH paper, basic (cat. no. P4536, Sigma-Aldrich).

3. ZipTip µC18 (cat. no. ZTC18M096, Millipore).

4. Solvents: ethanol (4Plex labelling) or isopropanol (8Plex labelling), acetonitrile.

5. Trifluoroacetic acid (TFA), 0.1% prepared in a glass bottle and conserved at +4°C.

6. α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (αCHCA) matrix (cat. no. M101, LaserBio Labs).

### ***2.4. RP Desalting***

1. Oasis HLB cartridges (Waters).

2. Solvents: methanol or acetonitrile.

3. Syringe, 5 mL.

4. Centrifugal vacuum concentrator.

## **2.5. OFFGEL-IEF**

1. 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies).
2. 3100 OFFGEL Fractionator Kit (Agilent Technologies), containing frames and cover seals.
3. IPG strips, pH 3-10, 13 or 24 cm (provided in the 3100 OFFGEL Fractionator Kit or cat. no. 17-6001-14 or 17-6002-44, GE Healthcare, *see Note 4*), stored at -20°C.
4. Glycerol 87% (cat. no. 17-1325-01, GE Healthcare).
5. IPG Buffer pH 3-10 (provided in the 3100 OFFGEL Fractionator Kit or cat. no. 17-6000-87, GE Healthcare).
6. Peptide OFFGEL Stock Solution (1.25X): 3% (v/v) glycerol, 1.2% (v/v) IPG Buffer pH 3-10, extemporaneously prepared (2 or 4 mL respectively for one 13 or 24-cm strip).
7. Peptide IPG Strip Rehydration Solution: Peptide OFFGEL Stock Solution (1.25X) diluted to 1X (0.5 or 1.0 mL respectively for one 13 or 24-cm strip).
8. PaperElectrode (cat. no. 80-6499-14, GE Healthcare), cutted and thinned in order to enter in tray lane.
9. Mineral oil (cat. no. 17-1335-01, GE Healthcare).
10. OFFGEL rinsing solution: 2.5 or 5.0 mL (respectively for one 13 or 24-cm strip) ultrapure water/methanol/formic acid (49/50/1).
11. Centrifugal vacuum concentrator.
12. Cleaning: neutral detergent (cat. no. 80-6452-78, GE Healthcare), toothbrush, hot 1% (w/v) SDS (60°C).

## **2.6. Capillary RPLC separation**

1. Capillary reversed-phase HPLC system: Ultimate 3000 nano-LC (Dionex) equipped with a C18 column (PepMap100, 3 $\mu$ m, 100A, 75 $\mu$ m id x 15cm, Dionex) or other systems using a capillary C18 column.
2. May be connected to a Probot microfraction collector (Dionex) for MALDI-TOF/TOF analysis.
3. Buffer A: 2% acetonitrile in ultrapure water with 0.05% TFA. Buffer B: 80% acetonitrile in ultrapure water with 0.04% TFA.
4. MALDI sample plates (1,664 spots per plate, Applied Biosystems).
5. Matrix: 2 mg/mL  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ CHCA) matrix (cat. no. M101, LaserBio Labs) in 70% acetonitrile/30% ultrapure water with 0.1% TFA. It contains 0.5

$\mu\text{L}/\text{mL}$  matrix of a MS internal calibrant: Glu1-fibrinopeptide (cat. no. F3261, Sigma-Aldrich), stock solution at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in acetonitrile/ultrapure water with 0.1% TFA (50/50).

## 2.7. MS/MS

1. Mass spectrometer able to measure at low  $m/z$ : Applied Biosystems 4800 Analyzer (MALDI-TOF/TOF). Apparatus from other suppliers should also be effective but MALDI-TOF/TOF provides more detailed peptide sequence analysis.
2. Analysis software as ProteinPilot Software (Applied Biosystems) fully compatible with iTRAQ quantification.

## 2.8. pI analysis

The pI value of each identified peptide can be calculated with the assistance of several free softwares:

- Compute pI/MW ([http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html))
- Peptide pI and MW Calculation (<http://www.fmi.ch/members/reto.portmann/pepeval.html>)
- Peptide property calculator (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>).

## 3. Methods

An overview of the method is presented in Figure 1. During the procedure, avoid too many repeated cycles of freezing/thawing of protein samples. Run samples to compare at the same time, in same experimental conditions.

### 3.1. Trypsin digestion (2.5 days)

1. As protein sample(s) may contain potential interfering substances with trypsin digestion and/or iTRAQ labelling (*see Note 1 and 2*), a clean up is realised by precipitating the protein sample(s) in 6 volumes cold acetone at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight (*see Note 5 and Note 6*) in polypropylene plastic 1.5 mL Eppendorf tubes (*see Note 7*).
2. The next day, pellet the sample(s) by centrifugation at 16,000 g for 15 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and decant acetone. Airdry the pellet for 2 min (*see Note 8*).

3. Resuspend the pellet in the adequate digestion buffer (*see Note 9*) in a volume which ideally permits to have a protein concentration of more than 5 µg/µL. Pellet insoluble materials by centrifugation (16,000 g for 15 min at 4 °C). Samples can be stored at -80 °C until use.
4. Determine the protein concentration using the sample buffer-compatible FluoroProfile Protein Quantification Kit -by diluting samples at least at 1/200 in ultrapure water- or the 2D-Quant kit (*see Note 10*), using BSA as the standard.
5. For up to 100 µg protein reaction, adjust, if possible, the volume of digestion buffer to 20 µL (*see Note 11*).
6. Add Reducing reagent in a volume equivalent to 1/10 of the starting volume (final concentration of about 5 mM). Vortex, spin and incubate the tubes at 60 °C for 1 hour.
7. Spin and add Cysteine-blocking reagent in a volume equivalent to 1/20 of the starting volume (final concentration of about 10 mM). Vortex, spin and incubate the tubes at room temperature for 10 min.
8. Reconstitute 25 µg trypsin with 25 µl ultrapure water and add 10 µl (10 µg) trypsin to each 100 µg protein reaction. Vortex, spin and incubate at 37°C for 40 h. At the end of the digestion, spin to bring the protein digest to the bottom of the tube(s). Samples can be stored at -80 °C until use.

### ***3.2. iTRAQ labelling, optional (3.5 hours)***

1. Check the pH of all protein digest samples by adding a very small amount of samples to a pH strip. pH must be between 8.0 and 9.0 (ideally at 8.5).
2. Spin each vial of iTRAQ reagent preably let to reach room temperature.
3. Add 70 µL of ethanol to each vial of iTRAQ Reagent - 4Plex or 50 µL of isopropanol to each vial of iTRAQ Reagent - 8Plex (*see Note 12*). Vortex and spin.
4. Transfer one iTRAQ Reagent (about 90 µL) to one 100 µg protein digest (33 µL).
5. Vortex, spin and incubate at room temperature for 3 h.
6. Verify the labelling quality and the protein quantification precision by pooling 1 µL of each sample of an experiment and analysing the pool by MS/MS after desalting using ZipTip devices according to standard procedures.
7. Stop labelling reaction by adding 120 µL ultrapure water to each tube. Samples can be stored at -80 °C until use.

8. Combine samples labelled with different iTRAQ reagents. Vortex and spin. This labelled pool can be stored at -80 °C until use.

### ***3.3. RP Desalting (3-4 hours)***

This step is absolutely essential before OFFGEL-IEF (*see Note 13*).

1. Connect the Oasis HLB cartridge to a syringe.
2. Condition the RP by drawing through methanol or acetonitrile and equilibrate with ultrapure water.
3. Load the sample and wash with ultrapure water.
4. Elute: draw through 1 mL methanol or acetonitrile. Collect the eluate in a polypropylene plastic 2 mL tube.
5. Evaporate in a centrifugal vacuum concentrator until no liquid is observable (*see Note 14*). Samples can be stored at -80 °C until use.

### ***3.4. OFFGEL- IEF (16-24 hours)***

This section follows the supplier manual "Quick Start Guide 4.0", updated on 1/22/2009 (Agilent Technologies) with some modifications.

1. Prepare the Peptide OFFGEL Stock Solution (1.25X) and Peptide IPG Strip Rehydration Solution.
2. Prepare the sample: resuspend the dried sample (400 µg, *see Note 15*) in 0.36 or 0.72 mL ultrapure water (respectively for one 13 or 24-cm strip). Vortex vigorously. Add 1.44 or 2.88 mL (respectively for one 13 or 24-cm strip) of the Peptide OFFGEL Stock Solution (1.25X). For the 24 fractions device, a sample transfer in a larger tube is required. Vortex.
3. Place tray in good orientation (you must read figures), remove the plastic film from the 13 or 24 cm length IPG strip gel and place the IPG strip in the tray (*see Note 16*) with the gel side up and the positive extremity on the left until the strip touches the edge of the tray. Delicately click the frame (with 12 or 24 wells according to the strip length, respectively 13 or 24 cm) on the gel starting from the left against the mechanical stop.
4. Rehydrate the gel by pipetting 20 µL of the Peptide IPG Strip Rehydration Solution into each of the wells. Tap the tray onto the desk to ensure that the rehydration solution reaches the gel. Rehydrate both gel extremities (*see Note 17*). Wait for 15 min and then absorb with a pipette tip the excess of solution at the strip extremities.

5. Wet 2 PaperElectrode pieces with ultrapure water and press on absorbent paper to eliminate the liquid excess. Put one paper on each strip extremity (*see Note 13*) letting a little interspace between the paper and the frame.
6. Load 150  $\mu\text{L}$  of sample in each of the 12 or 24 wells. Gently recover with appropriate frame cover seal.
7. Place the tray on the OFFGEL platform. Pipette mineral oil onto each end of the strip both sides of the covered frame. Wait 1 min for the oil to slip along the frame. Repipette mineral oil. PaperElectrode pads must be recovered. Pipette 2 mL mineral oil in all unused tray lanes.
8. Assembly first the anode electrode and slowly wedge the tray in the anode connector. Then position the cathode electrode close to the frame in good orientation (you must read figures). Electrodes must be in contact with PaperElectrode pads. Reposition the electrode pads if necessary.
9. Close the lid, set run temperature to 20°C and start the appropriate pre-entered program ("OG12PE" or "OG24PE").
10. At the end of the OFFGEL fractionation (flashing blue light), stop the apparatus, remove electrodes and carefully remove the frame cover seal without disassembly the frame. Pipette each well fraction in an annotated polypropylene plastic 1.5 mL Eppendorf tube.
11. Rinse each well by letting incubate 200  $\mu\text{L}$  of OFFGEL rinsing solution for 30 min. Pipette each rinsing fraction and combine with the corresponding peptide fraction.
12. Evaporate in a centrifugal vacuum concentrator until a glycerol pellet is observable. Fractions can be stored at -80 °C until use.
13. To avoid cross-contamination between samples, take care to clean the tray, frames, cover seals and electrodes with a neutral detergent using a toothbrush. Then rinse with water, then with 1% SDS at 60°C and, to finish, extensively with ultrapure water to eliminate salts and SDS. Blot oil drops on the OFFGEL platform.

### ***3.5. Capillary RPLC separation (6.5 hours for 3 OFFGEL fractions)***

1. Reconstitute up to 3 evaporated OFFGEL fractions in 20  $\mu\text{L}$  ultrapure water with 0.1% TFA. Vortex vigorously and transfer in appropriate chromatography vials.
2. Inject successively each sample onto the nanoLC system at a relatively slow flow rate (300 nL/min).
3. Peptides are desalted for 3 min using only Buffer A on the precolumn.

4. The separation uses the following gradient: 0 to 20% Buffer B in 10 min, 20% to 50% Buffer B in 65 min and 50% to 100% Buffer B in 20 min. Chromatograms are recorded at the wavelength of 214 nm.

5. Peptide fractions are collected for 90 min using a Probot microfraction collector. The matrix is continuously added to the column effluent via a micro "T" mixing piece at 1.2  $\mu\text{L}/\text{min}$  flow rate. After 11 min run, a start signal is sent to the Probot to initiate fractionation. Fractions are collected for 10 s and spotted on a MALDI sample plate. Up to 3 OFFGEL fractions can be separated on one MALDI plate. Plates can be conserved, protected from moisture, up to 2 weeks at room temperature before MS/MS analyses.

### ***3.6. MS/MS (30-48 hours per MALDI plate)***

All LC-MALDI sample positions are screened in MS-positive reflector mode using 1,500 laser shots. The fragmentation of automatically-selected precursors is performed at collision energy of 1 kV using air as collision gas (pressure of  $\sim 2 \times 10^{-6}$  Torr). MS spectra are acquired between  $m/z$  800 and 4000. The parent ion of Glu1-fibrinopeptide at  $m/z$  1570.677 diluted in the matrix (3 femtomoles per spot) is used for internal calibration. Up to 12 of the most intense ion signals per spot position having a  $S/N > 12$  are selected as precursors for MS/MS acquisition. Data processing for peptide and protein identification and iTRAQ quantification is performed using the Protein-Pilot software using the Paragon algorithm (**16**). Each MS/MS spectrum is searched against the Uniprot/Swissprot database for specific specie with the fixed modification of methyl methanethiosulfonate-labelled cysteine parameter enabled. Other parameters such as tryptic cleavage specificity, precursor ion mass accuracy and fragment ion mass accuracy are MALDI 4800 built-in functions of ProteinPilot software. The ProteinPilot software calculates a confidence percentage (the unused score) which reflects the probability that the hit is a false positive, meaning that at 95% confidence level, there is a false positive identification chance of about 5%. While this software automatically accepts all peptides having an identification confidence level  $> 1\%$ , only proteins having at least one peptide above 95% confidence are initially recorded. The low confidence peptides cannot give a positive protein identification by themselves, but may support the presence of a protein identified using other peptides with higher confidence. Searches against a concatenated database containing both forward and reversed sequences provide estimation of the false discovery rate.

### **3.7. pI analysis**

1. The identified peptides with a confidence score superior to 95% are selected.
2. Their pI are calculated taking into account possible modifications (N and Q deamidation, formyl, acetyl, pyroglu N-term...).
3. The average pI value is calculated with all the peptides of each OFFGEL fraction (Figure 2). A standard deviation is also evaluated for each fraction. This error may be due to a peptide misidentification (false positive) but it also may be due to the Bjellqvist algorithm (9). This algorithm is known to overestimate pI (17) values in the acidic range and to take not into account the iTRAQ groups in N-term position and /or on the lateral lysine chain. For these reasons, only the peptides showing an experimental pI deviating by more than one pI unit from the average value are excluded. For example, in fraction 3 of a neuroblastoma cell extract (14), we identified 1310 unique peptides. The pI average of all the peptides is 4.28 with a standard deviation of 0.45 (see electronic file). We kept peptides which had a pI value between 3.28 and 5.28. In these conditions, only 12 peptides were unvalidated (Table 1) and we obtained a new pI average value of 4.25 with a standard deviation of 0.13.

### **4. Notes**

1. Some lysis buffer components may interfere with trypsin digestion and/or iTRAQ labelling. Avoid thiols (dithiothreitol, mercaptoethanol ...) as they interfere with cysteine blocking. High amounts of denaturants and detergents inhibit trypsin activity. Primary amines (for example ammonium bicarbonate) react with iTRAQ reagents and affect peptide labelling efficacy. Sample clean up by acetone precipitation is highly recommended before trypsin digestion.
2. Avoid charged detergents, especially sodium dodecyl sulphate (SDS), as they influence peptide pI-fractionation during OFFGEL isoelectrofocalisation. In case when SDS is necessary for protein extraction, clean up the sample mixture using cation-exchange chromatography.
3. When urea is used in lysis buffer, keep protein samples in ice during sonication and run repeated short pulses. Temperature over 37°C causes urea to hydrolyze to isocyanate, which modifies proteins by carbamylation.
4. Neither Mann team (7) nor our team observed quality differences between Agilent and GE Healthcare IPG strips.

5. When iTRAQ labelling is planned, clean protein samples with acetone, not using acidic-based precipitation procedure (trichloroacetic acid or some commercially available kits).
6. Acetone precipitation encounters some protein lost. Prepare a larger quantity of starting biological material.
7. We suggest to aliquot in 200  $\mu\text{L}$  protein lysates and to add acetone. It will be then easier to resolubilize samples in 1.5 mL tubes.
8. After acetone decantation do not over-dry protein pellet, it would not dissolve in buffer.
9. Resolubilizing of proteins after precipitation is critical. Active vortexing and pipetting will help to dissolve pellets. Do not too much concentrate proteins in buffer.
10. Particular care should be taken for protein content estimation of samples, particularly when differential quantification between different extracts using iTRAQ labelling is necessary. According to our experience, a maximum of 30% variation in iTRAQ ratios (calculated by ProteinPilot Software, Applied Technologies) is tolerated. Quantitation must be accomplished just prior trypsin digestion, after acetone precipitation.
11. A protein concentration of 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  is ideal for iTRAQ labelling (it is recommended to label up to 100  $\mu\text{g}$  protein per iTRAQ reagent tube). In case when concentration is lower and sample volume therefore higher, proceed to trypsin digestion (adjust Reducing and Cysteine-blocking reagents volumes) and evaporate Digestion buffer (in a centrifugal vacuum concentrator) after trypsin digestion, before iTRAQ labelling. Then resuspend the peptide pellet in 20-30  $\mu\text{L}$  TEAB 0.5 M, pH 8.5.
12. A minimal organic solvent concentration of 65% is essential for iTRAQ labelling to succeed. The digest volume must not be too large (*see Note 11*).
13. Salts greatly interfere with OFFGEL isoelectrofocalization. Salt concentration in samples should not exceed 10 mM. Desalting just prior OFFGEL fractionation prevents current variations and guarantees a completed run in 24 h (pH 3-10 fractionation). If run is extended, PaperElectrode pads, which absorb water, ions and non focusing peptides during the run, can be changed. By modifying the run program, OFFGEL can be used to first desalt a protein (peptide) solution containing up to 100 mM salts (**18**).
14. When iTRAQ labelling is carried out, a brown pellet may appear at the end of the evaporation.
15. According to Agilent Technologies, up to 5 mg proteins can be loaded but the quality of the fractionation should be tested (*see Note 18*).
16. If a few IPG strips are run in parallel, position them in the middle of the tray.

17. The good rehydration of IPG strip extremities ensures a perfect sealing of the system and avoid sample leakage.

18. The quality of the fractionation could be evaluated by looking at the number of fractions in which each distinct peptide could be found. 95% of the identified peptides must be present in one or two adjacent fractions.

## 5. References

1. Hannig, K. (1982) New Aspects in Preparative and Analytical Continuous Free-Flow Cell Electrophoresis *Electrophoresis* **3**, 235-43.
2. Bier, M. (1998) Recycling isoelectric focusing and isotachopheresis *Electrophoresis* **19**, 1057-63.
3. Righetti, P. G., Wenisch, E., Faupel, M. (1989) Preparative Protein-Purification in a Multi-Compartment Electrolyzer with Immobiline Membranes *Journal of Chromatography* **475**, 293-309.
4. Righetti, P. G., Wenisch, E., Jungbauer, A., Katinger, H., Faupel, M. (1990) Preparative Purification of Human Monoclonal-Antibody Isoforms in a Multicompartment Electrolyzer with Immobiline Membranes *Journal of Chromatography* **500**, 681-96.
5. Ros, A., Faupel, M., Mees, H., van Oostrum, J., Ferrigno, R., Reymond, F., Michel, P., Rossier, J. S., Girault, H. H. (2002) Protein purification by Off-Gel electrophoresis *Proteomics* **2**, 151-6.
6. Michel, P. E., Reymond, F., Arnaud, I. L., Josserand, J., Girault, H. H., Rossier, J. S. (2003) Protein fractionation in a multicompartment device using Off-Gel (TM) isoelectric focusing *Electrophoresis* **24**, 3-11.
7. Hubner, N.C., Ren, S., Mann, M. (2008) Peptide separation with immobilized pI strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis *Proteomics* **8**, 4862-72.
8. Essader, A.S., Cargile, B.J., Bundy, J.L. Jr. (2005) A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics *Proteomics* **5**, 24-34.
9. Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Frutiger, S., Hughes, G.J., Hochstrasser, D. (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized

- pH gradients can be predicted from their amino acid sequences *Electrophoresis* **14**, 1023-31.
10. Krügsveld, J., Gauci, S., Dormeyer, W., Heck, A.J. (2006) In-gel isoelectric focusing of peptides as a tool for improved protein identification *J. Proteome Res.* **5**, 1721-30.
  11. Cargile, B.J., Bundy, J.L., Freeman, T.W., Stephenson, J.L. Jr. (2004) Immobilized pH gradients as a first dimension in shotgun proteomics and analysis of accuracy of pI predictability of peptides *J. Proteome Res.* **3**, 112-9.
  12. Lengqvist, J., Uhlen, K., Lehtio, J. (2007) iTRAQ compatibility of peptide immobilized pH gradient isoelectric focusing *Proteomics* **7**, 1746-52.
  13. Chenau, J., Michelland, S., Sidibe, J., Seve, M. (2008) Peptides OFFGEL electrophoresis: a suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible with quantitative iTRAQ labeling *Proteome Sci.* **26**, 6-9.
  14. Ernoult, E., Gamelin, E., Guette, C. (2008) Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation *Proteome Sci.* **6**, 27-40.
  15. Ernoult, E., Bourreau, A., Gamelin, E., Guette, C. (2010) A proteomic approach for plasma biomarker discovery with iTRAQ labelling and OFFGEL fractionation *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:927917.
  16. Shilov, I.V., Seymour, S.L., Patel, A.A., Loboda, A. *et al.* (2007) The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1638-55.
  17. Cargile, B.J., Talley, D.L., Stephenson, J.L. (2004) Immobilized pH gradients as a first dimension in shotgun proteomics and analysis of the accuracy of pI predictability of peptides *Electrophoresis* **25**, 936-45.
  18. Arnaud, I.L., Josserand, J., Jensen, H., Lion, N., Roussel, C., Girault, H.H. (2005) Salt removal during Off-Gel electrophoresis of protein samples *Electrophoresis* **26**, 1650-8.

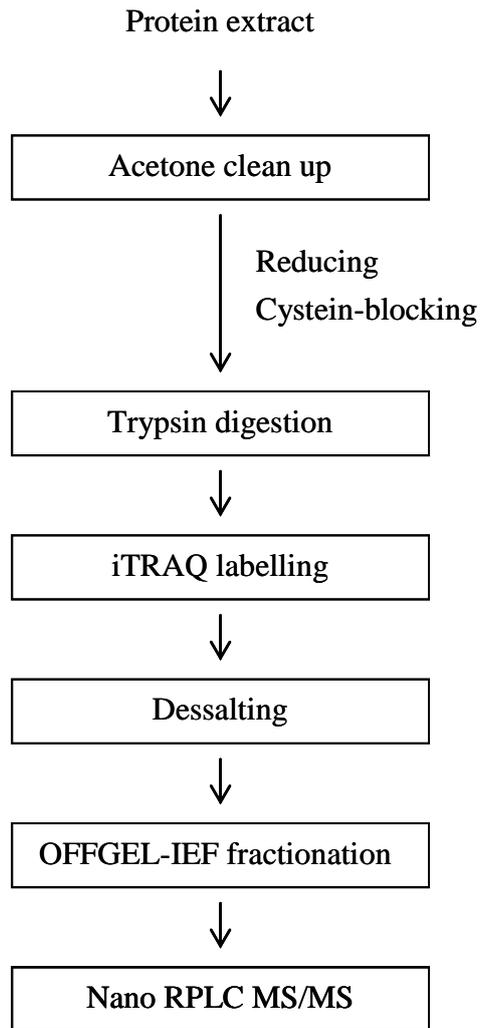


Figure 1: **Overview of the workflow.** It is based on the use of iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation to improve proteome coverage of complex samples.

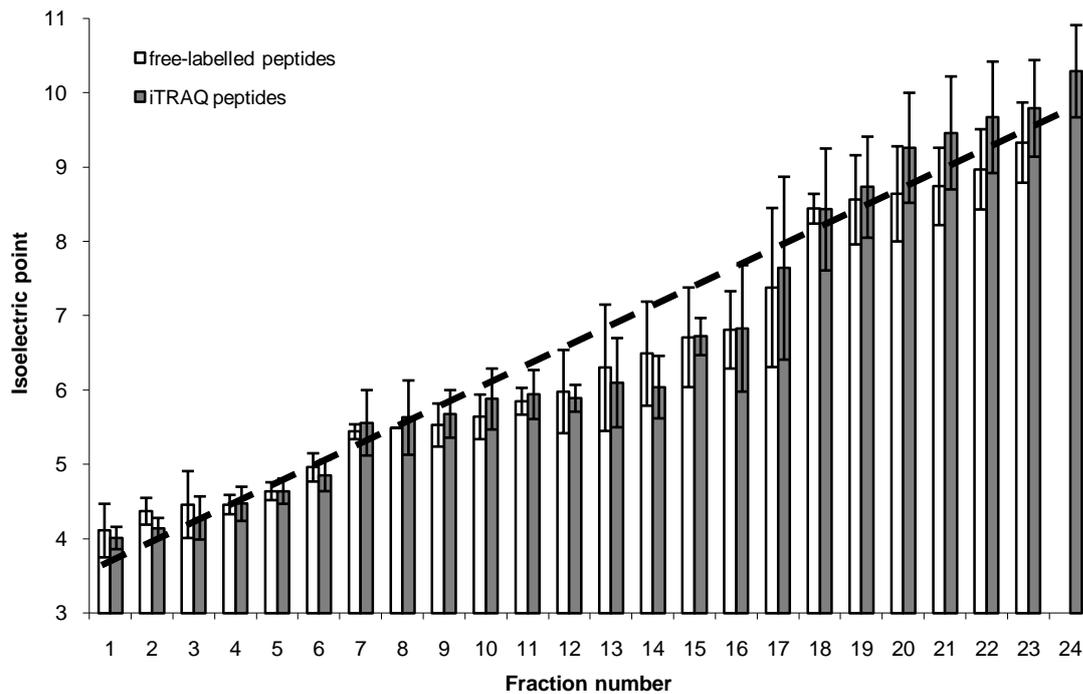


Figure 2: **Analysis of SH-SY5Y peptides pI after OFFGEL fractionation and MALDI-MS/MS identification.** The average experimental pH of all peptides in a single fraction after filtering for false positive is presented as bars; white bars: free-labelled peptides; dark bars: iTRAQ peptides. Error bars indicate the SD of each fraction's experimental pI. The broken line is based on the theoretical pI values for an IPG strip of 24 cm ranging from pH 3–10; Agilent Technologies provided the theoretical pI values.

**Table 1: pI-based unvalidated peptides in fraction 3 of one OFFGEL experiment with a neuroblastoma cell extract (i: iTRAQ-4plex; Me: methyl; MC: methio(C); O: oxidation; D: deamidated; P: pyru-Glu; Ox: Oxoalanine).**

Identified peptides	Modifications	pI
QGYSVEYQLLNGGELHR	Delta:H(2)C(2)@N-term	5.4
VREWQHEEFYR	i@N-term; O(R)@2	5.5
SGPFGQIFRPDNFVFGESGAGNNWAK	i@N-term; D(Q)@17; D(N)@22; i(K)@26	5.79
KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR	i@N-term; i(K)@1; Me(N)@6	5.96
VGWEQLLTTIAR	Delta:H(2)C(2)@N-term	5.97
LIALLEVLSQK	Delta:H(2)C(2)@N-term; i(K)@11	6
SLVIPEKFEHILR	i@N-term; Sulfo(S)@1; i(K)@7; D(Q)@9	6.48
LSVLASGLRAAVR	i@N-term; Phospho(S)@2; Dehydrated(S)@6	7.18
EACVALQRQLSRPR	i@N-term; MC@3	10.27
GGGGGGGGGGGRERDRRR	i@N-term; O(R)@13; Me(E)@14	11.82
GERGVRGVRRGGGRGQR	i@N-term; D(Q)@2; D(R)@6; O(R)@9; Arg->GluSA(R)@13	12.18
SRGGGGGGFHRRGGGGGR	i@N-term; D(R)@11; D(R)@12	12.48

## Bibliographie

Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. (2002) Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res.* 62(13):3609-14

Addona TA, Abbatiello SE, Schilling B, Skates SJ, Mani DR, Bunk DM *et al.* (2009) Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat Biotechnol.* 27(7):633-41.

Adelsberger H, Quasthoff S, Grosskreutz J, Lepier A, Eckel F, Lersch C. (2000) The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons. *Eur J Pharmacol.* 406(1):25-32.

Aebersold R, Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 422(6928):198-207.

Ahrens CH, Brunner E, Qeli E, Basler K, Aebersold R. (2010) Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(11):789-801.

Alder J, Thakker-Varia S, Bangasser DA, Kuroiwa M, Plummer MR, Shors TJ, Black IB. (2003) Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci.* 23(34):10800-8.

Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. (2004) The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin Biochem.* 37(11):943-52.

Allain P, Heudi O, Cailleux A, Le Bouil A, Larra F, Boisdron-Celle M, Gamelin E. (2000) Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients. *Drug Metab Dispos.* 28(11):1379-84.

Alvarez S, Berla BM, Sheffield J, Cahoon RE, Jez JM, Hicks LM. (2009) Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics.* 9(9):2419-31.

Amin HM, Ahmad S, Walenga JM, Hoppensteadt DA, Leitz H, Fareed J. (2000) Soluble P-selectin in human plasma: effect of anticoagulant matrix and its levels in patients with cardiovascular disorders. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 6(2):71-76.

Amin MA, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K. (2008) Nucleophosmin is required for chromosome congression, proper mitotic spindle formation, and kinetochore-microtubule attachment in HeLa cells. *FEBS Lett.* 582(27):3839-44.

An J, Huang YC, Xu QZ, Zhou LJ, Shang ZF, Huang B, Wang Y, Liu XD, Wu DC, Zhou PK. (2010) DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol Biol.* 11:18.

Anderson NL, Anderson NG. (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis.* 19(11):1853-61.

Anderson NL, Anderson NG. (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 1(11):845-67.

Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A. (2004) The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics*. 3:311–326.

Anderson NL, Anderson NG, Haines LR, Hardie DB, Olafson RW, Pearson TW. (2004) Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J Proteome Res*. 3(2):235-44.

Anderson L, Hunter CL. (2006) Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics*. 5(4):573-88.

Anderson NL. (2010) The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin Chem*. 56(2):177-85.

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. (2004) Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 350(23):2343-51.

André T, De Gramont A. (2006) [A good cooperation between industry and French medical oncologists]. *Bull Cancer*. 93 Suppl 1:S3-4.

André T, Tournigand C, Achille E, Tubiana-Mathieu N, Lledo G, Raoul Y, Carola E, Flesch M, Muron T, Boutan-Laroze A, Guérin Meyer V *et al.* (2006) [Adjuvant treatment of colon cancer MOSAIC study's main results]. *Bull Cancer*. 93 Suppl 1:S5-9.

Ang CS, Rothacker J, Patsiouras H, Burgess AW, Nice EC. (2010) Murine fecal proteomics: a model system for the detection of potential biomarkers for colorectal cancer. *J Chromatogr A*. 1217(19):3330-40.

Antonacopoulou AG, Argyriou AA, Scopa CD, Kottorou A, Kominea A, Peroukides S, Kalofonos HP. (2010) Integrin beta-3 L33P: a new insight into the pathogenesis of chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy? *Eur J Neurol*. 17(7):963-8.

Argyriou AA, Polychronopoulos P, Iconomou G, Chroni E, Kalofonos HP. (2008) A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treat Rev*. 34(4):368-77.

Argyriou AA, Antonacopoulou AG, Scopa CD, Kottorou A, Kominea A, Peroukides S, Kalofonos HP. (2009) Liability of the voltage-gated sodium channel gene SCN2A R19K polymorphism to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Oncology*. 77(3-4):254-6.

Arnaud IL, Josserand J, Jensen H, Lion N, Roussel C, Girault HH. (2005) Salt removal during Off-Gel electrophoresis of protein samples. *Electrophoresis*. 26:1650-8.

Asara JM, Christofk HR, Freemark LM, Cantley LC. (2008) A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen. *Proteomics*. 8(5):994-999.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 25(1):25-9.

Bachi A, Bonaldi T. (2008) Quantitative proteomics as a new piece of the systems biology puzzle. *J Proteomics*. 71(3):357-67.

Baggerly KA, Morris JS, Coombes KR. (2004) Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments. *Bioinformatics*. 20(5):777-85.

Baggerly KA, Morris JS, Edmonson SR, Coombes KR. (2005) Signal in noise: evaluating reported reproducibility of serum proteomic tests for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 97(4):307-9.

- Bahir I, Linial M. (2005) ProTeus: identifying signatures in protein termini. *Nucleic Acids Res.* 33(Web Server issue):W277-80.
- Bailey D, Zanders E, Dean P. (2001) The end of the beginning for genomic medicine. *Nat Biotechnol.* 19(3):207-9.
- Balayssac D, Ferrier J, Descoeur J, Ling B, Pezet D, Eschalier A, Authier N. (2011) Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: from clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin Drug Saf.*
- Baldwin TA, Ostergaard HL. (2002) The protein-tyrosine phosphatase CD45 reaches the cell surface via golgi-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 277(52):50333-40.
- Bayir H, Kapralov AA, Jiang J, Huang Z, Tyurina YY, Tyurin VA, Zhao Q, Belikova NA *et al.* (2009) Peroxidase mechanism of lipid-dependent cross-linking of synuclein with cytochrome C: protection against apoptosis versus delayed oxidative stress in parkinson disease. *J Biol Chem.* 284:15951-15969.
- Beadle GW, Tatum EL. (1941) Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27(11):499-506.
- Becker KG, Barnes KC, Bright TJ, Wang SA. (2004) The genetic association database. *Nat Genet.* 36(5):431-2.
- Becker T, Guiard B, Thornton N, Zufall N, Stroud DA, Wiedemann N, Pfanner N. (2010) Assembly of the Mitochondrial Protein Import Channel: Role of Tom5 in Two-Stage Interaction of Tom40 with the SAM Complex. *Mol Biol Cell.* [Epub ahead of print].
- Bendall SC, Hughes C, Stewart MH, Doble B, Bhatia M, Lajoie GA. (2008) Prevention of amino acid conversion in SILAC experiments with embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics.* 7(9):1587-97.
- Beretta L. (2007) Proteomics from the clinical perspective: many hopes and much debate. *Nat Methods.* 4(10):785-6.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7):517-29.
- Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P. (2004) Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell.* 15(5):2324-34.
- Bertucci F, Birnbaum D, Goncalves A. (2006) Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics.* 5(10):1772-86.
- Bier M. (1998) Recycling isoelectric focusing and isotachopheresis. *Electrophoresis.* 19: 1057-63.
- Bijian K, Mlynarek AM, Balys RL, Jie S, Xu Y, Hier MP, Black MJ, Di Falco MR, LaBoissiere S, Alaoui-Jamali MA. (2009) Serum proteomic approach for the identification of serum biomarkers contributed by oral squamous cell carcinoma and host tissue microenvironment. *J Proteome Res.* 8(5):2173-85.
- Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser D. (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis.* 14(10):1023-1031.
- Blagoev B, Ong SE, Kratchmarova I, Mann M. (2004) Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat Biotechnol.* 22(9):1139-45.
- Blesa JM, Marco VG, Giner-Bosch V, Cerezuela P, Candel VA. (2010) Phase II Trial of Oxaliplatin and Capecitabine After Progression to First-Line Chemotherapy in Androgen-Independent Prostate Cancer Patients. *Am J Clin Oncol.*

- Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, Jarzebinska J, Silberring J. (2007) Methods for samples preparation in proteomic research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 849(1-2):1-31.
- Boja E, Rivers R, Kinsinger C, Mesri M, Hiltke T, Rahbar A, Rodriguez H. (2010) Restructuring proteomics through verification. *Biomark Med.* 4(6):799-803.
- Boja E, Hiltke T, Rivers R, Kinsinger C, Rahbar A, Mesri M, Rodriguez H. (2011) Evolution of clinical proteomics and its role in medicine. *J Proteome Res.* 10(1):66-84.
- Boldt K, van Reeuwijk J, Gloeckner CJ, Ueffing M, Roepman R. (2009) Tandem affinity purification of ciliopathy-associated protein complexes. *Methods Cell Biol.* 91:143-60.
- Bommer UA, Thiele BJ. (2004) The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol.* 36(3):379-85.
- Bonfils C, Charasse S, Bonfils JP, Larroque C. (1995) Luminescent visualization of low amounts of cytochrome P450 and hemoproteins by luminol in acrylamide gels. *Anal Biochem.* 226(2):302-6.
- Boschetti E, Lomas L, Citterio A, Righetti PG. (2007) Romancing the "hidden proteome", Anno Domini two zero zero seven. *J Chromatogr A.* 1153(1-2):277-90.
- Boschetti E, Giorgio Righetti P. (2008) Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues. *Biotechniques.* 44(5):663-5.
- Bose R, Molina H, Patterson AS, Bitok JK, Periaswamy B, Bader JS, Pandey A, Cole PA. (2006) Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(26):9773-8.
- Bouslimani A, Bec N, Glueckmann M, Hirtz C, Larroque C. (2010) Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry of oxaliplatin derivatives in heated intraoperative chemotherapy (HIPEC)-like treated rat kidney. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24(4):415-21.
- Brackley KI, Grantham J. (2009) Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress Chaperones.* 14(1):23-31.
- Brand J, Haslberger T, Zolg W, Pestlin G, Palme S. (2006) Depletion efficiency and recovery of trace markers from a multiparameter immunodepletion column. *Proteomics.* 6(11):3236-42.
- Brandon NJ, Jovanovic JN, Smart TG, Moss SJ. (2002) Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors. *J Neurosci.* 22(15):6353-61.
- Brun V, Masselon C, Garin J, Dupuis A. (2009) Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *J Proteomics.* 72(5):740-9.
- Bukrinsky MI. (2002) Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications. *Trends Immunol.* 23(7):323-5.
- Burger K, Mühl B, Harasim T, Rohrmoser M, Malamoussi A, Orban M, Kellner M, Gruber-Eber A, Kremmer E, Hölzel M, Eick D. (2010) Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem.* 285(16):12416-25.
- Cargile BJ, Bundy JL, Freeman TW, Stephenson JL Jr. (2004) Gel based isoelectric focusing of peptides and the utility of isoelectric point in protein identification. *J Proteome Res.* 3:112-119.
- Cargile BJ, Bundy JL, Stephenson JL Jr. (2004) Potential for false positive identification from large databases through tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* 3:1082-1085.

- Cargile BJ, Talley DL, Stephenson JL. (2004) Immobilized pH gradients as a first dimension in shotgun proteomics and analysis of the accuracy of pI predictability of peptides. *Electrophoresis*. 25:936-945.
- Carlson K, Ehrlich M. (2008) Distribution of SH-SY5Y human neuroblastoma cells in the cell cycle following exposure to organophosphorus compounds. *J Biochem Mol Toxicol*. 22:187-201.
- Carr S, Aebersold R, Baldwin M, Burlingame A, Clauser K, Nesvizhskii A. (2004) The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Mol Cell Proteomics*. 3(6):531-3.
- Cavaletti G, Tredici G, Petruccioli MG, Dondè E, Tredici P, Marmiroli P, Minoia C, Ronchi A, Bayssas M, Etienne GG. (2001) Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur J Cancer*. 37(18):2457-63.
- Cavaletti G, Petruccioli MG, Marmiroli P, Rigolio R, Galbiati S, Zoia C, Ferrarese C, Tagliabue E, Dolci C, Bayssas M, Griffon Etienne G, Tredici G. (2002) Circulating nerve growth factor level changes during oxaliplatin treatment-induced neurotoxicity in the rat. *Anticancer Res*. 22(6C):4199-204.
- Chakravarti B, Mallik B, Chakravarti DN. (2010) Proteomics and systems biology: application in drug discovery and development. *Methods Mol Biol*. 662:3-28.
- Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. (2005) Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol*. 53(1):3-11.
- Chao J, Schmaier A, Chen LM, Yang Z, Chao L. (1996) Kallistatin, a novel human tissue kallikrein inhibitor: levels in body fluids, blood cells, and tissues in health and disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 127(6):612-620.
- Chen L, Liu L, Huang S. (2008) Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radic Biol Med*. 45:1035-1044.
- Chenau J, Michelland S, Seve M. (2008) [Secretome: definitions and biomedical interest]. *Rev Med Interne*. 29(7):606-8.
- Chenau J, Michelland S, Sidibe J, Seve M. (2008) Peptides OFFGEL electrophoresis: a suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible with quantitative iTRAQ labeling. *Proteome Sci*. 6-9.
- Chenau J, Michelland S, de Fraipont F, Josserand V, Coll JL, Favrot MC, Seve M. (2009) The cell line secretome, a suitable tool for investigating proteins released in vivo by tumors: application to the study of p53-modulated proteins secreted in lung cancer cells. *J Proteome Res*. 8(10):4579-91.
- Chevalier F. (2010) Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics. *Proteome Sci*. 8:23.
- Chignard N, Shang S, Wang H, Marrero J, Bréchet C, Hanash S, Beretta L. (2006) Cleavage of endoplasmic reticulum proteins in hepatocellular carcinoma: Detection of generated fragments in patient sera. *Gastroenterology*. 130(7):2010-22.
- Chong PK, Gan CS, Pham TK, Wright PC. (2006) Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) reproducibility: Implication of multiple injections. *J Proteome Res*. 5(5):1232-40.
- Chuang DM, Hough C, Senatorov VV. (2005) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 45:269-90.
- Cohen J. (2001) The proteomics payoff. *Technol Rev*. 55-60.

- Conde C, Cáceres A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci.* 10(5):319-32.
- Constantinescu R, Constantinescu AT, Reichmann H, Janetzky B. (2007) Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl.* 72:17-28.
- Corasaniti MT, Maiuolo J, Maida S, Fratto V, Navarra M, Russo R, Amantea D, Morrone LA, Bagetta G. (2007) Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. *Br J Pharmacol.* 151(4):518-29.
- Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC. (2000) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis.* 21(6):1104-15.
- Corzett TH, Fodor IK, Choi MW, Walsworth VL, Chromy BA, Turteltaub KW, McCutchen-Maloney SL. (2006) Statistical analysis of the experimental variation in the proteomic characterization of human plasma by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteome Res.* 5(10):2611-9.
- Courson DS, Rock RS. (2010) Actin crosslink assembly and disassembly mechanics for alpha-actinin and fascin. *J Biol Chem.* 285(34):26350-7.
- Cravatt BF, Simon GM, Yates JR 3rd. (2007) The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature.* 450(7172):991-1000.
- Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol.* 158(3):507-17.
- Cunningham SK, Loughlin T, Culliton M, McKenna TJ. (1984) Plasma sex hormone-binding globulin levels decrease during the second decade of life irrespective of pubertal status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 58(5):915-918.
- D'Alessandro A, Zolla L. (2010) Pharmacoproteomics: a chess game on a protein field. *Drug Discov Today.* 15(23-24):1015-23.
- Dantzer F, de La Rubia G, Ménissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V. (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry.* 39(25):7559-69.
- Dayon L, Hainard A, Licker V, Turck N, Kuhn K, Hochstrasser DF, Burkhard PR, Sanchez JC. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal Chem.* 80(8):2921-31.
- Deganuto M, Cesaratto L, Bellarosa C, Calligaris R, Vilotti S, Renzone G, Foti R, Scaloni A, Gustincich S, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Tell G. (2010) A proteomic approach to the bilirubin-induced toxicity in neuronal cells reveals a protective function of DJ-1 protein. *Proteomics.* 10(8):1645-57.
- Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4(5):P3.
- Derheimer FA, Chang CW, Ljungman M. (2005) Transcription inhibition: a potential strategy for cancer therapeutics. *Eur J Cancer.* 41(16):2569-76.
- Desoize B, Madoulet C. (2002) Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 42(3):317-25.
- DeSouza LV, Taylor AM, Li W, Minkoff MS, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW. (2008) Multiple reaction monitoring of mTRAQ-labeled peptides enables absolute quantification of endogenous levels of a potential cancer marker in cancerous and normal endometrial tissues. *J Proteome Res.* 7(8):3525-34.

- DeSouza LV, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW. (2009) Absolute quantification of potential cancer markers in clinical tissue homogenates using multiple reaction monitoring on a hybrid triple quadrupole/linear ion trap tandem mass spectrometer. *Anal Chem.* 81(9):3462-70.
- Di Michele M, Marcone S, Cicchillitti L, Della Corte A, Ferlini C, Scambia G, Donati MB, Rotilio D. (2010) Glycoproteomics of paclitaxel resistance in human epithelial ovarian cancer cell lines: towards the identification of putative biomarkers. *J Proteomics.* 73(5):879-98.
- Dobreva I, Fielding A, Foster LJ, Dedhar S. (2008) Mapping the integrin-linked kinase interactome using SILAC. *J Proteome Res.* 7(4):1740-9.
- Domon B, Aebersold R. (2006) Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 312(5771):212-7.
- Donzelli E, Carfi M, Miloso M, Strada A, Galbiati S, Bayssas M, Griffon-Etienne G, Cavaletti G, Petruccioli MG, Tredici G. (2004) Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurooncol.* 67(1-2):65-73.
- Dowling P, Clynes M. (2011) Conditioned media from cell lines: A complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics.* 11(4):794-804.
- Du Bois D, Du Bois EF. (1916) A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Nutrition.* 5(5):303-11; discussion 312-3.
- Duan X, Kelsen SG, Clarkson AB Jr, Ji R, Merali S. (2010) SILAC analysis of oxidative stress-mediated proteins in human pneumocytes: new role for treacle. *Proteomics.* 10(11):2165-74.
- Dzeja P, Terzic A. (2009) Adenylate Kinase and AMP Signaling Networks: Metabolic Monitoring, Signal Communication and Body Energy Sensing. *Int J Mol Sci.* 10(4):1729-72.
- Elias D, Sideris L, Pocard M, Edè C, Ben Hassouna D, Ducreux M, Boige V, Côté JF, Lasser P. (2004) Efficacy of intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin in colorectal peritoneal carcinomatosis. Preliminary results in 24 patients. *Ann Oncol.* 15(5):781-5.
- Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C. (2009) Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom.* 44(12):1637-60.
- Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C, Comella JX. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 75(3):991-1003.
- Engelsberger WR, Erban A, Kopka J, Schulze WX. (2006) Metabolic labeling of plant cell cultures with K(15)NO<sub>3</sub> as a tool for quantitative analysis of proteins and metabolites. *Plant Methods.* 2:14.
- Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, Beijnen JH. (2006) Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci.* 27(5):251-9.
- Ernoul E, Gamelin E, Guette C. (2008) Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci.* 6:27.
- Ernoul E, Bourreau A, Gamelin E, Guette C. (2010) A proteomic approach for plasma biomarker discovery with iTRAQ labelling and OFFGEL fractionation. *J Biomed Biotechnol.* 2010:927917.
- Essader AS, Cargile BJ, Bundy JL Jr. (2005) A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. *Proteomics.* 5:24-34.
- Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. (2010) Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(4):276-87.

- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246(4926):64-71.
- Fields S. (2001) Proteomics. *Proteomics in genomeland*. *Science*. 291(5507):1221-4.
- Flockerzi V. (2007) An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*. (179):1-19.
- Fraterman S, Zeiger U, Khurana TS, Rubinstein NA, Wilm M. (2007) Combination of peptide OFFGEL fractionation and label-free quantitation facilitated proteomics profiling of extraocular muscle. *Proteomics*. 7:3404-3416.
- Freue GV, Sasaki M, Meredith A, Günther OP, Bergman A, Takhar M, Mui A, Balshaw RF, Ng RT, Opushneva N, Hollander Z, Li G, Borchers CH, Wilson-McManus J, McManus BM, Keown PA, McMaster WR; Genome Canada Biomarkers in Transplantation Group. (2010) Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection. *Mol Cell Proteomics*. 9(9):1954-67.
- Fu C, Hu J, Liu T, Ago T, Sadoshima J, Li H. (2008) Quantitative analysis of redox-sensitive proteome with DIGE and ICAT. *J Proteome Res*. 7(9):3789-802.
- Fu C, Wu C, Liu T, Ago T, Zhai P, Sadoshima J, Li H. (2009) Elucidation of thioredoxin target protein networks in mouse. *Mol Cell Proteomics*. 8(7):1674-87.
- Fung ET. (2010) A recipe for proteomics diagnostic test development: the OVA1 test, from biomarker discovery to FDA clearance. *Clin Chem*. 56(2):327-9.
- Gadad SS, Shandilya J, Swaminathan V, Kundu TK. (2009) Histone chaperone as coactivator of chromatin transcription: role of acetylation. *Methods Mol Biol*. 523:263-78.
- Gamelin L. (2004) Caractérisation et prévention de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. Thèse de doctorat. Museum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Gamelin L, Boisdrón-Celle M, Delva R, Guérin-Meyer V, Ifrah N, Morel A, Gamelin E. (2004) Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 10(12 Pt 1):4055-61.
- Gamelin L, Boisdrón-Celle M, Morel A, Gamelin E. (2006) [Oxaliplatin neurotoxicity]. *Bull Cancer*. 93 Suppl 1:S17-22.
- Gamelin L, Capitain O, Morel A, Dumont A, Traore S, Anne le B, Gilles S, Boisdrón-Celle M, Gamelin E. (2007) Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway. *Clin Cancer Res*. 13(21):6359-68.
- Gan CS, Chong PK, Pham TK, Wright PC. (2007) Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *J Proteome Res*. 6:821-827.
- Gartel AL. (2008) Transcriptional inhibitors, p53 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1786(2):83-6.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A, *et al*. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 31(13):3784-3788.
- Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y. (2009) Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett*. 458(2):93-5.
- Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M *et al*. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*. 440(7084):631-6.

- Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, Zheng D, Du J, Korbelt JO, Emanuelsson O, Zhang ZD, Weissman S, Snyder M. (2007) What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res.* 17(6):669-81.
- Gevaert K, Impens F, Ghesquière B, Van Damme P, Lambrechts A, Vandekerckhove J. (2008) Stable isotopic labeling in proteomics. *Proteomics.* 8(23-24):4873-85.
- Giddings JC. (1987) Concepts and comparisons in multidimensional separation. *J High Resol Chromatogr.* 10:319-23.
- Gilany K, Van Elzen R, Mous K, Coen E, Van Dongen W, Vandamme S, Gevaert K, Timmerman E, Vandekerckhove J, Dewilde S, Van Ostade X, Moens L. (2008) The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: an enlarged proteome. *Biochim Biophys Acta.* 1784(7-8):983-5.
- Gill JS, Windebank AJ. (1998) Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J Clin Invest.* 101:2442-2450.
- Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. (2006) Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res.* 84(4):755-67.
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. (1999) Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 6):761-72.
- Giuliani F, De Vita F, Colucci G, Pisconti S. (2010) Maintenance therapy in colon cancer. *Cancer Treat Rev.* 36 Suppl 3:S42-5.
- Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Alberts SR. (2004) A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 22(1):23-30.
- Gomes-Alves P, Couto F, Pesquita C, Coelho AV, Penque D. (2010) Rescue of F508del-CFTR by RXR motif inactivation triggers proteome modulation associated with the unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta.* 1804(4):856-65.
- Gonias SL, Oakley AC, Walther PJ, Pizzo SV. (1984) Effects of diethyldithiocarbamate and nine other nucleophiles on the intersubunit protein cross-linking and inactivation of purified human alpha 2-macroglobulin by cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 44(12 Pt 1):5764-70.
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol.* 59(4):657-63.
- Görg A, Postel W, Günther S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 9(9):531-46.
- Goshima Y, Usui H, Shiozawa T, Hida T, Kuraoka S, Takeshita S, Yamashita N, Ichikawa Y, Kamiya Y, Gotoh T, Gotoh T. (2010) Computational analysis of the effects of antineoplastic agents on axonal transport. *J Pharmacol Sci.* 114(2):168-79.
- Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. (2000) Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res.* 6(4):1205-18.
- Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. (2004) Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov.* 3(1):11-2.
- Gramont (de) A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. (2000) Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 18(16):2938-47.

- Grenningloh G, Soehrman S, Bondallaz P, Ruchti E, Cadas H. (2004) Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J Neurobiol.* 58:60-69.
- Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapied B, Pelhate M, Gamelin E. (2001) A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *J Neurophysiol.* 85(5):2293-7.
- Grothey A, Nikcevic DA, Sloan JA, Kugler JW, Silberstein PT, Dentchev T, Wender DB, Novotny PJ, Chitaley U, Alberts SR, Loprinzi CL. (2011) Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7. *J Clin Oncol.* 29(4):421-7.
- Gunnlaugsson A, Anderson H, Lind P, Glimelius B, Johnsson A. (2010) Multicentre phase I-II trial of capecitabine and oxaliplatin in combination with radiotherapy for unresectable pancreatic and biliary tract cancer: The CORGI-U study. *Radiother Oncol.* 95(3):292-7.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 17(10):994-9.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.* 19(3):1720-30.
- Haab BB, Geierstanger BH, Michailidis G, *et al.* (2005) Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. *Proteomics.* 5(13): 3278-3291.
- Häggglund P, Bunkenborg J, Maeda K, Svensson B. (2008) Identification of thioredoxin disulfide targets using a quantitative proteomics approach based on isotope-coded affinity tags. *J Proteome Res.* 7(12):5270-6.
- Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Bocchini C, Valle D, McKusick VA. (2002) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 30(1):52-5.
- Han X, Aslanian A, Yates JR 3rd. (2008) Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 12(5):483-90.
- Hanash S, Celis JE. (2002) The Human Proteome Organization: a mission to advance proteome knowledge. *Mol Cell Proteomics.* 1(6):413-4.
- Hannig K. (1982) New Aspects in Preparative and Analytical Continuous Free-Flow Cell Electrophoresis. *Electrophoresis.* 3:235-43.
- Hansen KC, Schmitt-Ulms G, Chalkley RJ, Hirsch J, Baldwin MA, Burlingame AL. (2003) Mass spectrometric analysis of protein mixtures at low levels using cleavable <sup>13</sup>C-isotope-coded affinity tag and multidimensional chromatography. *Mol Cell Proteomics.* 2(5):299-314.
- Harsha HC, Molina H, Pandey A. (2008) Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *Nat Protoc.* 3(3):505-16.
- Heller M, Michel PE, Morier P, Crettaz D, Wenz C, Tissot JD, Reymond F, Rossier JS. (2005) Two-stage Off-Gel isoelectric focusing: protein followed by peptide fractionation and application to proteome analysis of human plasma. *Electrophoresis.* 26:1174-1188.
- Hergenroeder G, Redell JB, Moore AN, *et al.* (2008) Identification of serum biomarkers in brain-injured adults: potential for predicting elevated intracranial pressure. *Journal of Neurotrauma.* 25(2):79-93.
- Higa LM, Caruso MB, Canellas F, Soares MR, Oliveira-Carvalho AL, Chapeaurouge DA, Almeida PM, Perales J, Zingali RB, Da Poian AT. (2008) Secretome of HepG2 cells infected with dengue virus: implications for pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1784(11):1607-16.

- Hirano N, Shibasaki F, Sakai R, Tanaka T, Nishida J, Yazaki Y, Takenawa T, Hirai H. (1995) Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation. *Eur J Biochem.* 234(1):336-42.
- Hochster HS, Grothey A, Childs BH. (2007) Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity. *J Clin Oncol.* 25(25):4028-9.
- Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, Howell SB. (2004) The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 66(4):817-23.
- Hoopmann MR, Merrihew GE, von Haller PD, MacCoss MJ. (2009) Post analysis data acquisition for the iterative MS/MS sampling of proteomics mixtures. *J Proteome Res.* 8(4):1870-5.
- Hörth P, Miller CA, Preckel T, Wenz C. (2006) Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Mol Cell Proteomics.* 5:1968-1974.
- Hortin GL, Sviridov D. (2010) The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. *J Proteomics.* 73(3):629-36.
- Hou S, Reynolds MF, Horrigan FT, Heinemann SH, Hoshi T. (2006) Reversible binding of heme to proteins in cellular signal transduction. *Acc Chem Res.* 39(12):918-24.
- Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. (2010) Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol.* 77(6):887-94.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 4(1):44-57.
- Huang RS, Dolan ME. (2010) Approaches to the discovery of pharmacogenomic markers in oncology: 2000–2010–2020. *Pharmacogenomics.* 11(4):471-4.
- Huber LA. (2003) Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(1):74-80.
- Hubner NC, Ren S, Mann M. (2008) Peptide separation with immobilized pI strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis. *Proteomics.* 8(23-24):4862-72.
- Hung SY, Huang WP, Liou HC, Fu WM. (2009) Autophagy protects neuron from Abeta-induced cytotoxicity. *Autophagy.* 5:502-510.
- Iliuk A, Galan J, Tao WA. (2009) Playing tag with quantitative proteomics. *Anal Bioanal Chem.* 393(2):503-13.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(22):14298-302.
- Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics.* 4(9):1265-72.
- Jackson CL. (2003) Membrane traffic: Arl GTPases get a GRIP on the Golgi. *Curr Biol.* 13(5):R174-6.
- James P. (1997) Of genomes and proteomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(1):1-6.
- Jamieson SM, Liu J, Connor B, McKeage MJ. (2005) Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss. *Cancer Chemother Pharmacol.* 56(4):391-9.

- Jamieson SM, Subramaniam J, Liu JJ, Jong NN, Ip V, Connor B, McKeage MJ. (2009) Oxaliplatin-induced loss of phosphorylated heavy neurofilament subunit neuronal immunoreactivity in rat DRG tissue. *Mol Pain*. 5:66.
- Jazwa A, Cuadrado A. (2010) Targeting heme oxygenase-1 for neuroprotection and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets*. 11(12):1517-31.
- Jensen ON. (2006) Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(6):391-403.
- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, Bork P, von Mering C. (2009) STRING 8 - a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*. 37(Database issue):D412-6.
- Jha S, Dutta A. (2009) RVB1/RVB2: running rings around molecular biology. *Mol Cell*. 34(5):521-33.
- Ji YH, Ji JL, Sun FY, Zeng YY, He XH, Zhao JX, Yu Y, Yu SH, Wu W. (2010) Quantitative proteomics analysis of chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells by iTRAQ labeling coupled with on-line two-dimensional LC/MS/MS. *Mol Cell Proteomics*. 9(3):550-64.
- Johnsen JI, Aurelio ON, Kwaja Z, Jørgensen GE, Pellegata NS, Plattner R, Stanbridge EJ, Cajot JF. (2000) p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest. *Int J Cancer*. 88(5):685-91.
- Jung Y, Lippard SJ. (2007) Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev*. 107(5):1387-407.
- Jung JE, Moon JY, Ghil SH, Yoo BS. (2009) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits neurite outgrowth in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol Lett*. 188:153-156.
- Jungblut P, Thiede B, Zimny-Arndt U, Müller EC, Scheler C, Wittmann-Liebold B, Otto A. (1996) Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis*. 17(5):839-47.
- Jungblut PR, Holzhütter HG, Apweiler R, Schlüter H. (2008) The speciation of the proteome. *Chem Cent J*. 2:16.
- Kamper EF, Papahiliss AD, Angelopoulou MK, *et al*. (1999) Serum levels of tetranectin, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 in B-chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Biochemistry*. 32(8):639-645.
- Kaplan DR, Matsumoto K, Lucarelli E, Thiele CJ. (1993) Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. *Eukaryotic Signal Transduction Group. Neuron*. 11(2):321-31.
- Karas M, Glückmann M, Schäfer J. (2000) Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom*. 35(1):1-12.
- Karsan A, Eigl BJ, Flibotte S, Gelmon K, Switzer P, Hassell P, Harrison D, Law J, Hayes M, Stillwell M, Xiao Z, Conrads TP, Veenstra T. (2005) Analytical and preanalytical biases in serum proteomic pattern analysis for breast cancer diagnosis. *Clin Chem*. 51(8):1525-8.
- Keenan J, Murphy L, Henry M, Meleady P, Clynes M. (2009) Proteomic analysis of multidrug-resistance mechanisms in adriamycin-resistant variants of DLKP, a squamous lung cancer cell line. *Proteomics*. 9(6):1556-66.
- Kelland L. (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 7(8):573-84.

- Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E, Carr SA. (2007) Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics*. 6(12):2212-29.
- Kim GP, Erlichman C. (2007) Oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 3(2):281-94.
- Kim I, Xu W, Reed JC. (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 7(12):1013-30.
- Kim BK, Lee JW, Park PJ, Shin YS, Lee WY, Lee KA, Ye S, Hyun H, Kang KN, Yeo D, Kim Y, Ohn SY, Noh DY, Kim CW. (2009) The multiplex bead array approach to identifying serum biomarkers associated with breast cancer. *Breast Cancer Res*. 11(2):R22.
- Kimura I, Yoshioka M, Konishi M, Miyake A, Itoh N. (2005) Neudesin, a novel secreted protein with a unique primary structure and neurotrophic activity. *J Neurosci Res*. 79(3):287-94.
- Kimura I, Nakayama Y, Yamauchi H, Konishi M, Miyake A, Mori M, Ohta M, Itoh N, Fujimoto M. (2008) Neurotrophic activity of neudesin, a novel extracellular heme-binding protein, is dependent on the binding of heme to its cytochrome b5-like heme/steroid-binding domain. *J Biol Chem*. 283(7):4323-31.
- Kiss JZ, Muller D. (2001) Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Rev Neurosci*. 12(4):297-310.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 419(6905):367-74.
- Knochenmuss R, Stortelder A, Breuker K, Zenobi R. (2000) Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization *J Mass Spectrom*. 35(11):1237-45.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 9(7):505-18.
- Knudsen NØ, Andersen SD, Lützen A, Nielsen FC, Rasmussen LJ. (2009) Nuclear translocation contributes to regulation of DNA excision repair activities. *DNA Repair (Amst)*. 8(6):682-9.
- Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. (2005) Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res*. 52(1):5-14.
- Kolkman A, Daran-Lapujade P, Fullaondo A, Olsthoorn MM, Pronk JT, Slijper M, Heck AJ. (2006) Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. *Mol Syst Biol*. 2:2006.0026.
- Komuro A, Masuda Y, Kobayashi K, Babbitt R, Gunel M, Flavell RA, Marchesi VT. (2004) The AHNAKs are a class of giant propeller-like proteins that associate with calcium channel proteins of cardiomyocytes and other cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(12):4053-8.
- Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan MC. (2005) Oxaliplatin-induced neurotoxicity and the development of neuropathy. *Muscle Nerve*. 32(1):51-60.
- Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan MC. (2006) Oxaliplatin and axonal Na<sup>+</sup> channel function in vivo. *Clin Cancer Res*. 12(15):4481-4.
- Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X *et al*. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 440(7084):637-43.

- Krüger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Lubner CA, Forner F, Schmidt S, Zanivan S, Fässler R, Mann M. (2008) SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell*. 134(2):353-64.
- Krügsveld J, Gauci S, Dormeyer W, Heck AJ. (2006) In-gel isoelectric focusing of peptides as a tool for improved protein identification. *J Proteome Res*. 5:1721-1730.
- Kuhn E, Wu J, Karl J, Liao H, Zolg W, Guild B. (2004) Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and <sup>13</sup>C-labeled peptide standards. *Proteomics*. 4(4):1175-86.
- Kuhn E, Addona T, Keshishian H, Burgess M, Mani DR, Lee RT, Sabatine MS, Gerszten RE, Carr SA. (2009) Developing multiplexed assays for troponin I and interleukin-33 in plasma by peptide immunoaffinity enrichment and targeted mass spectrometry. *Clin Chem*. 55(6):1108-17.
- Kulasingam V, Diamandis EP. (2008) Tissue culture-based breast cancer biomarker discovery platform. *Int J Cancer*. 123(9):2007-12.
- Kulasingam V, Pavlou MP, Diamandis EP. (2010) Integrating high-throughput technologies in the quest for effective biomarkers for ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 10(5):371-8.
- Kumar S, Bandyopadhyay U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*. 157(3):175-88.
- Kusmann M, Panchaud A, Affolter M. (2010) Proteomics in nutrition: status quo and outlook for biomarkers and bioactives. *J Proteome Res*. 9(10):4876-87.
- Kuster B, Schirle M, Mallick P, Aebersold R. (2005) Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(7):577-83.
- Kweekel DM, Gelderblom H, Guchelaar HJ. (2005) Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat Rev*. 31(2):90-105.
- Kweekel DM, Gelderblom H, Antonini NF, Van der Straaten T, Nortier JW, Punt CJ, Guchelaar HJ. (2009) Glutathione-S-transferase pi (GSTP1) codon 105 polymorphism is not associated with oxaliplatin efficacy or toxicity in advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*. 45(4):572-8.
- Lambert D, Berrahmoune H, Herbeth B, Siest G, Visvikis-Siest S. (2007) [Preanalytical variations of proteic biomarkers]. *Med Sci (Paris)*. 23 Spec No 1:9-12.
- Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol*. 4:222.
- Lawlor K, Nazarian A, Lacomis L, Tempst P, Villanueva J. (2009) Pathway-based biomarker search by high-throughput proteomics profiling of secretomes. *J Proteome Res*. 8(3):1489-503.
- Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lloriot MA. (2006) Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 12(10):3050-6.
- Lee C, Goldberg J. (2010) Structure of coatamer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell*. 142(1):123-32.
- Lengqvist J, Uhlen K, Lehtio J. (2007) iTRAQ compatibility of peptide immobilized pH gradient isoelectric focusing. *Proteomics*. 7:1746-1752.

- Lescuyer P, Chevallet M, Rabilloud T. (2004) [Concepts and therapeutic perspectives of proteomics]. *Med Sci (Paris)*. 20(5):587-92.
- Letarte PB, Lieberman K, Nagatani K, Haworth RA, Odell GB, Duff TA. (1993) Hemin: levels in experimental subarachnoid hematoma and effects on dissociated vascular smooth-muscle cells. *J Neurosurg*. 79(2):252-5.
- Levi F, Perpoint B, Garufi C, Focan C, Chollet P, Depres-Brummer P, Zidani R, Brienza S, Itzhaki M, Iacobelli S, *et al.* (1993) Oxaliplatin activity against metastatic colorectal cancer. A phase II study of 5-day continuous venous infusion at circadian rhythm modulated rate. *Eur J Cancer*. 29A(9):1280-4.
- Lévi F, Metzger G, Massari C, Milano G. (2000) Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin Pharmacokinet*. 38(1):1-21.
- Lewis JA, Dennis WE, Hadix J, Jackson DA. (2010) Analysis of secreted proteins as an in vitro model for discovery of liver toxicity markers. *J Proteome Res*. 9(11):5794-802.
- Li J, Steen H, Gygi SP. (2003) Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response. *Mol Cell Proteomics*. 2(11):1198-204.
- Li N, Yuan K, Yan F, Huo Y, Zhu T, Liu X, Guo Z, Yao X. (2009) PinX1 is recruited to the mitotic chromosome periphery by Nucleolin and facilitates chromosome congression. *Biochem Biophys Res Commun*. 384(1):76-81.
- Li J, Rix U, Fang B, Bai Y, Edwards A, Colinge J, Bennett KL, Gao J, Song L, Eschrich S, Superti-Furga G, Koomen J, Haura EB. (2010) A chemical and phosphoproteomic characterization of dasatinib action in lung cancer. *Nat Chem Biol*. 6(4):291-9.
- Lim S, Choong LY, Kuan CP, Yunhao C, Lim YP. (2009) Regulation of Macrophage Inhibitory Factor (MIF) by Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in the MCF10AT model of breast cancer progression. *J Proteome Res*. 8(8):4062-76.
- Lim C, Tordjmann D, Gornet JM, Nemeth J, Valleur P, Pocard M. (2010) [Prospective study of quality of life after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy using oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis]. *Bull Cancer*. 97(9):1053-60.
- Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, Yates JR 3rd. (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 17(7):676-82.
- Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. (2003) Clinical proteomics: written in blood. *Nature*. 425(6961):905.
- Liotta LA, Petricoin EF. (2010) Mass spectrometry-based protein biomarker discovery: solving the remaining challenges to reach the promise of clinical benefit. *Clin Chem*. 56(10):1641-2.
- Lipton SA, Bossy-Wetzel E. (2002) Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell*. 111(2):147-50.
- Liu H, Sadygov RG, Yates JR 3rd. (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*. 76(14):4193-201.
- Liu T, Qian WJ, Chen WN, Jacobs JM, Moore RJ. (2005) Improved proteome coverage by using high efficiency cysteinyl peptide enrichment: the human mammary epithelial cell proteome. *Proteomics*. 5:1263-1273.
- Liu T, Qian WJ, Mottaz HM, Gritsenko MA, Norbeck AD, Moore RJ, Purvine SO, Camp DG 2nd, Smith RD. (2006) Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 5(11):2167-74.

- Liu JJ, Jamieson SM, Subramaniam J, Ip V, Jong NN, Mercer JF, McKeage MJ. (2009) Neuronal expression of copper transporter 1 in rat dorsal root ganglia: association with platinum neurotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64(4):847-56.
- Liu X, Ren Z, Zhan R, Wang X, Wang X, Zhang Z, Leng X, Yang Z, Qian L. (2009) Prohibitin protects against oxidative stress-induced cell injury in cultured neonatal cardiomyocyte. *Cell Stress Chaperones.* 14(3):311-9.
- Lockhart BP, Walther B. (2009) [Biomarkers: "Found in translation"]. *Med Sci (Paris).* 25(4):423-30.
- Longley MJ, Smith LA, Copeland WC. (2009) Preparation of Human Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Protein. *Methods Mol Biol.* 554:73-85.
- Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau JL, Schott G, Benbouzid M, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F. (2006) Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain.* 7(1):32-9.
- Lukas TJ, Haiech J, Lau W, Craig TA, Zimmer WE, Shattuck RL, Shoemaker MO, Watterson DM. (1988) Calmodulin and calmodulin-regulated protein kinases as transducers of intracellular calcium signals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 53 (Pt 1):185-93.
- Ly L, Wasinger VC. (2011) Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: Tools for the complex proteome. *Proteomics.* 11(4):513-34.
- Maiguel DA, Jones L, Chakravarty D, Yang C, Carrier F. (2004) Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol.* 24(9):3703-11.
- Makridakis M, Vlahou A. (2010) Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *J Proteomics.* 73(12):2291-305.
- Malik R, Dulla K, Nigg EA, Körner R. (2010) From proteome lists to biological impact-tools and strategies for the analysis of large MS data sets. *Proteomics.* 10(6):1270-83.
- Mallick P, Schirle M, Chen SS, Flory MR, Lee H, Martin D, Ranish J, Raught B, Schmitt R, Werner T, Kuster B, Aebersold R. (2007) Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol.* 25(1):125-31.
- Mallick P, Kuster B. (2010) Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol.* 28(7):695-709.
- Mallory JC, Crudden G, Johnson BL, Mo C, Pierson CA, Bard M, Craven RJ. (2005) Dap1p, a heme-binding protein that regulates the cytochrome P450 protein Erg11p/Cyp51p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 25(5):1669-79.
- Mandal R, Kalke R, Li XF. (2004) Interaction of oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin with hemoglobin and the resulting release of a heme group. *Chem Res Toxicol.* 17(10):1391-7.
- Mannherz HG, Hannappel E. (2009) The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66(10):839-51.
- Marambaud P, Dreses-Werringloer U, Vingtdoux V. (2009) Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 4:20.
- Marksteiner J, Bauer R, Kaufmann WA, Weiss E, Barnas U, Maier H. (1999) PE-11, a peptide derived from chromogranin B, in the human brain. *Neuroscience.* 91(3):1155-70.
- Marouga R, David S, Hawkins E. (2005) The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 382(3):669-78.

- Marquet P, Rousseau A. (2008) [Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of anticancer agents]. *Bull Cancer*. 95(10):903-9.
- Marrer E, Dieterle F. (2010) Impact of biomarker development on drug safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 243(2):167-79.
- Martin J. (1997) Molecular chaperones and mitochondrial protein folding. *J Bioenerg Biomembr*. 29(1):35-43.
- Martin LJ. (2008) DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 67(5):377-87.
- Martin JN, Bair TB, Bode N, Dauer WT, Gonzalez-Alegre P. (2009) Transcriptional and proteomic profiling in a cellular model of DYT1 dystonia. *Neuroscience*. 164(2):563-72.
- Mathé G, Kidani Y, Triana K, Brienza S, Ribaud P, Goldschmidt E, Ecstein E, Despax R, Musset M, Misset JL. (1986) A phase I trial of trans-1-diaminocyclohexane oxalato-platinum (1-OHP). *Biomed Pharmacother*. 40(10):372-6.
- McClatchy DB, Dong MQ, Wu CC, Venable JD, Yates JR 3rd. (2007) <sup>15</sup>N metabolic labeling of mammalian tissue with slow protein turnover. *J Proteome Res*. 6(5):2005-10.
- McClelland CM, Gullick WJ. (2007) Proteomic identification of secreted proteins as surrogate markers for signal transduction inhibitor activity. *Br J Cancer*. 96(2):284-9.
- McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. (2009) Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther*. 8(1):10-6.
- Merrell K, Southwick K, Graves SW, Esplin MS, Lewis NE, Thulin CD. (2004) Analysis of low-abundance, low-molecular-weight serum proteins using mass spectrometry. *J Biomol Tech*. 15(4):238-48.
- Meyer L, Patte-Mensah C, Taleb O, Mensah-Nyagan AG. (2011) Allopregnanolone prevents and suppresses oxaliplatin-evoked painful neuropathy: multi-parametric assessment and direct evidence. *Pain*. 152(1):170-81.
- Michel PE, Reymond F, Arnaud I, Josserand J, Girault HH, Rossier JS. (2003) Protein fractionation in a multicompartiment device using Off-Gel isoelectric focusing. *Electrophoresis*. 24:3-11.
- Michel PE, Crettaz D, Morier P, Heller M, Gallot D, Tissot JD, Reymond F, Rossier JS. (2006) Proteome analysis of human plasma and amniotic fluid by Off-Gel isoelectric focusing followed by nano-LC-MS/MS. *Electrophoresis*. 27:1169-1181.
- Milla P, Airoidi M, Weber G, Drescher A, Jaehde U, Cattel L. (2009) Administration of reduced glutathione in FOLFOX4 adjuvant treatment for colorectal cancer: effect on oxaliplatin pharmacokinetics, Pt-DNA adduct formation, and neurotoxicity. *Anticancer Drugs*. 20(5):396-402.
- Milner E, Barnea E, Beer I, Admon A. (2006) The turnover kinetics of major histocompatibility complex peptides of human cancer cells. *Mol Cell Proteomics*. 5(2):357-65.
- Minakata K, Nozawa H, Okamoto N, Suzuki O. (2006) Determination of platinum derived from cisplatin in human tissues using electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 832(2):286-91.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. (2001) NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*. 276(19):16391-8.
- Misek DE, Kuick R, Wang H, *et al.* (2005) A wide range of protein isoforms in serum and plasma uncovered by a quantitative intact protein analysis system. *Proteomics*. 5(13):3343-3352.

- Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. (2006) The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med.* 10(2):353-63.
- Miyoshi M, Okajima T, Matsuda T, Fukuda MN, Nadano D. (2007) Bystin in human cancer cells: intracellular localization and function in ribosome biogenesis. *Biochem J.* 404(3):373-81.
- Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Hostettler A, Rescher U, Draeger A. (2007) Annexins as intracellular calcium sensors. *Cell Calcium.* 41(3):207-19.
- Montrichard F, Alkhalfoui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB. (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J Proteomics.* 72(3):452-74.
- Moon KH, Upreti VV, Yu LR, Lee IJ, Ye X, Eddington ND, Veenstra TD, Song BJ. (2008) Mechanism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-mediated mitochondrial dysfunction in rat liver. *Proteomics.* 8(18):3906-18.
- Musselman I, Speicher DW. (2005) Human serum and plasma proteomics. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 24:Unit 24.1.
- Nakao M, Barrero RA, Mukai Y, Motono C, Suwa M, Nakai K. (2005) Large-scale analysis of human alternative protein isoforms: pattern classification and correlation with subcellular localization signals. *Nucleic Acids Res.* 33(8):2355-63.
- Ndozangue-Touriguine O, Hamelin J, Breard J. (2008) Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 76:11-18.
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 284(20):13291-5.
- Nickel W, Seedorf M. (2008) Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24:287-308.
- Nickel W, Rabouille C. (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(2):148-55.
- Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ. (2002) The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci.* 59(1):143-55.
- Nishikaze T, Takayama M. (2006) Cooperative effect of factors governing molecular ion yields in desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20:376-382.
- O'Farrell PH. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250(10):4007-21.
- Okines AF, Ashley SE, Cunningham D, Oates J, Turner A, Webb J, Saffery C, Chua YJ, Chau I. (2010) Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for advanced esophagogastric cancer: dose-finding study for the prospective multicenter, randomized, phase II/III REAL-3 trial. *J Clin Oncol.* 28(25):3945-50.
- Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R *et al.* (2005) Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics.* 5(13):3226-45.
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. (2002) *Mol Cell Proteomics.* 1(5):376-86.

- Pan S, Chen R, Aebersold R, Brentnall TA. (2010) Mass spectrometry based glycoproteomics - from a proteomics perspective. *Mol Cell Proteomics*.
- Pandey A, Mann M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 405(6788):837-46.
- Pardo B, Contreras L, Serrano A, Ramos M, Kobayashi K, Iijima M, Saheki T, Satrústegui J. (2006) Essential role of aralar in the transduction of small Ca<sup>2+</sup> signals to neuronal mitochondria. *J Biol Chem*. 281(2):1039-47.
- Park SB, Lin CS, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC. (2009) Oxaliplatin-induced neurotoxicity: changes in axonal excitability precede development of neuropathy. *Brain*. 132(Pt 10):2712-23.
- Park SB, Lin CS, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC. (2011) Utilizing natural activity to dissect the pathophysiology of acute oxaliplatin-induced neuropathy. *Exp Neurol*. 227(1):120-7.
- Paschen W, Mengesdorf T. (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium*. 38(3-4):409-15.
- Patel R, Holt M, Philipova R, Moss S, Schulman H, Hidaka H, Whitaker M. (1999) Calcium/Calmodulin-dependent Phosphorylation and Activation of Human Cdc25-C at the G2/M Phase Transition in HeLa Cells. *J Biol Chem*. 274(12):7958-68.
- Paulovich AG, Whiteaker JR, Hoofnagle AN, Wang P. (2008) The interface between biomarker discovery and clinical validation: The tar pit of the protein biomarker pipeline. *Proteomics Clin Appl*. 2(10-11):1386-1402.
- Pavlou MP, Diamandis EP. (2010) The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? *J Proteomics*. 73(10):1896-906.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20(18):3551-67.
- Pernemalm M, Lewensohn R, Lehtiö J. (2009) Affinity prefractionation for MS-based plasma proteomics. *Proteomics*. 9(6):1420-7.
- Pétain A, Chatelut E. (2008) [Anticancer drug dose individualisation: from body surface area to physiology]. *Bull Cancer*. 95(10):895-901.
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. (2002) Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 359(9306):572-7.
- Pichler P, Köcher T, Holzmann J, Mazanek M, Taus T, Ammerer G, Mechtler K. (2010) Peptide labeling with isobaric tags yields higher identification rates using iTRAQ 4-plex compared to TMT 6-plex and iTRAQ 8-plex on LTQ Orbitrap. *Anal Chem*. 82(15):6549-58.
- Pierce A, Unwin RD, Evans CA, Griffiths S, Carney L, Zhang L, Jaworska E, Lee CF, Blinco D, Okoniewski MJ, *et al.* (2007) Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of 6 leukaemogenic tyrosine kinases. *Mol Cell Proteomics*. 7:853-83.
- Pimkin M, Markham GD. (2008) The CBS subdomain of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase regulates purine nucleotide turnover. *Mol Microbiol*. 68(2):342-59.
- Pischetsrieder M, Baeuerlein R. (2009) Proteome research in food science. *Chem Soc Rev*. 38(9):2600-8.
- Polanski M, Anderson NL. (2006) A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomark Insights*. 1:1-48.

- Popowicz GM, Schleicher M, Noegel AA, Holak TA. (2006) Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci.* 31(7):411-9.
- Porcal W, Hernández P, González M, Ferreira A, Olea-Azar C, Cerecetto H, Castro A. (2008) Heteroaryl nitrones as drugs for neurodegenerative diseases: synthesis, neuroprotective properties, and free radical scavenger properties. *J Med Chem.* 51(19):6150-9.
- Pratt JM, Petty J, Riba-Garcia I, Robertson DH, Gaskell SJ, Oliver SG, Beynon RJ. (2002) Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 1(8):579-91.
- Pusztai L, Gregory BW, Baggerly KA, Peng B, Koomen J *et al.* (2004) Pharmacoproteomic analysis of prechemotherapy and postchemotherapy plasma samples from patients receiving neoadjuvant or adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer.* 100(9):1814-22.
- Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS. (2007) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res.* 67(20):9809-16.
- Qian WJ, Jacobs JM, Liu T, Camp DG 2nd, Smith RD. (2006) Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. *Mol Cell Proteomics.* 5(10):1727-44.
- Raasi S, Wolf DH. (2007) Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol.* 18(6):780-91.
- Rabilloud T. (2002) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics.* 2(1):3-10.
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics.* 73(11):2064-77.
- Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, *et al.* (2005) HUPO plasma proteome project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics.* 5(13):3262-3277.
- Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. (2002) Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12:1231-1245.
- Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. (2002) Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther.* 1(3):227-35.
- Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell W Jr, Kaye J, Manczak M. (2005) Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis.* 7(2):103-17; discussion 173-80.
- Reix S, Mechawar N, Susin SA, Quirion R, Krantic S. (2007) Expression of cortical and hippocampal apoptosis-inducing factor (AIF) in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 28(3):351-6.
- Reynolds KJ, Yao X, Fenselau C. (2002) Proteolytic <sup>18</sup>O labeling for comparative proteomics: evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent. *J Proteome Res.* 1(1):27-33.
- Rifai N, Gillette MA, Carr SA. (2006) Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol.* 24(8):971-83.
- Righetti PG, Wenisch E, Faupel M. (1989) Preparative Protein-Purification in a Multi-Compartment Electrolyzer with Immobilized Membranes. *Journal of Chromatography.* 475: 293-309.

Righetti PG, Wenisch E, Jungbauer A, Katinger H, Faupel M. (1990) Preparative Purification of Human Monoclonal-Antibody Isoforms in a Multicompartment Electrolyzer with Immobiline Membranes. *Journal of Chromatography*. 500:681-96.

Righetti PG, Boschetti E, Lomas L, Citterio A. (2006) Protein Equalizer Technology: the quest for a "democratic proteome". *Proteomics*. 6(14):3980-92.

Righetti PG, Boschetti E. (2007) Sherlock Holmes and the proteome--a detective story. *FEBS J*. 274(4):897-905.

Ripley RT, Davis JL, Kemp CD, Steinberg SM, Toomey MA, Avital I. (2010) Prospective randomized trial evaluating mandatory second look surgery with HIPEC and CRS vs. standard of care in patients at high risk of developing colorectal peritoneal metastases. *Trials*. 11:62.

Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. (1996) Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol*. 52(12):1855-65.

Robert J, Le Morvan V. (2008) [Biological bases for individualising prescriptions in oncology: the germline genome]. *Bull Cancer*. 95(10):911-21.

Rogers S, Girolami M, Kolch W, Waters KM, Liu T, Thrall B, Wiley HS. (2008) Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics*. 24(24):2894-900.

Rohe HJ, Ahmed IS, Twist KE, Craven RJ. (2009) PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol Ther*. 121(1):14-9.

Rolland D, Raharijaona M, Barbarat A, Houlgatte R, Thieblemont C. (2010) Inhibition of GST-pi nuclear transfer increases mantle cell lymphoma sensitivity to cisplatin, cytarabine, gemcitabine, bortezomib and doxorubicin. *Anticancer Res*. 30(10):3951-7.

Ros A, Faupel M, Mees H, van Oostrum J, Ferrigno R, Reymond F, Michel P, Rossier JS, Girault HH. (2002) Protein purification by Off-Gel electrophoresis. *Proteomics*. 2:151-6.

Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 205:698-9.

Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 222(5191):385-6.

Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 71:741-749.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, *et al.* (2004) Multiplex protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagent. *Mol Cell Proteomics*. 3:1154-1169.

Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK, Hart LL, Gupta S, Garay CA, Burger BG, Le Bail N, Haller DG. (2003) Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol*. 21(11):2059-69.

Ruddock LW, Molinari M. (2006) N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci*. 119(Pt 21):4373-80.

Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, Catalano V, Ficarella R, Maltese P, Bissoni R, Masi G, Schiavon G, Giordani P, Giustini L, Falcone A, Tonini G, Silva R, Mattioli R, Floriani I, Magnani M.

- (2007) Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol.* 25(10):1247-54.
- Sadygov RG, Cociorva D, Yates JR 3rd. (2004) Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. *Nat Methods.* 1(3):195-202.
- Saito Y, Watanabe Y, Saito E, Honjoh T, Takahashi K (2001) Production and application of monoclonal antibodies to human selenoprotein P. *J Health Sci.* 47:346-352.
- Sandström J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. (1994) 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry.* 269(29):19163-19166.
- Sawyers CL. (2008) The cancer biomarker problem. *Nature.* 452(7187):548-52.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418(6894):191-5.
- Scarpulla RC. (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 88(2):611-38.
- Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. (1999) Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol Pharmacol.* 56(3):633-43.
- Scherl A, Francois P, Charbonnier Y, Deshusses JM, Koessler T, Huyghe A, Bento M, Stahl-Zeng J, Fischer A, *et al.* (2006) Exploring glycopeptide-resistance in *Staphylococcus aureus*: a combined proteomics and transcriptomics approach for the identification of resistance-related markers. *BMC Genomics.* 7:296.
- Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. (2005) A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics.* 5(1):4-15. Erratum in: *Proteomics.* 5(3):826.
- Schmidt A, Gehlenborg N, Bodenmiller B, Mueller LN, Campbell D, Mueller M, Aebersold R, Domon B. (2008) An integrated, directed mass spectrometric approach for in-depth characterization of complex peptide mixtures. *Mol Cell Proteomics.* 7(11):2138-50.
- Schrump DS. (2009) Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin Cancer Res.* 15(12):3947-57.
- Schulze WX, Usadel B. (2010) Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annu Rev Plant Biol.* 61:491-516.
- Schwacke JH, Hill EG, Krug EL, Comte-Walters S, Schey KL. (2009) iQuantitor: a tool for protein expression inference using iTRAQ. *BMC Bioinformatics.* 10:342.
- Schwartz R, Ting CS, King J. (2001) Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life. *Genome Res.* 11:703-709.
- Scuteri A, Nicolini G, Miloso M, Bossi M, Cavaletti G, Windebank AJ, Tredici G. (2006) Paclitaxel toxicity in post-mitotic dorsal root ganglion (DRG) cells. *Anticancer Res.* 26(2A):1065-70.
- Scuteri A, Galimberti A, Maggioni D, Ravasi M, Pasini S, Nicolini G, Bossi M, Miloso M, Cavaletti G, Tredici G. (2009) Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis. *Neurotoxicology.* 30(2):312-9.
- Scuteri A, Galimberti A, Ravasi M, Pasini S, Donzelli E, Cavaletti G, Tredici G. (2010) NGF protects Dorsal Root Ganglion neurons from oxaliplatin by modulating JNK/SapK and ERK1/2. *Neurosci Lett.* 486(3):141-5.

- Seetharam RN, Sood A, Basu-Mallick A, Augenlicht LH, Mariadason JM, Goel S. (2010) Oxaliplatin resistance induced by ERCC1 up-regulation is abrogated by siRNA-mediated gene silencing in human colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* 30(7):2531-8.
- Service RF. (2008) Proteomics. Will biomarkers take off at last? *Science.* 321(5897):1760.
- Sethuraman M, McComb ME, Heibeck T, Costello CE, Cohen RA. (2004) Isotope-coded affinity tag approach to identify and quantify oxidant-sensitive protein thiols. *Mol Cell Proteomics.* 3(3):273-8.
- Shao Y, Czymmek KJ, Jones PA, Fomin VP, Akanbi K, Duncan RL, Farach-Carson MC. (2009) Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296(5):C1067-78.
- Shen Y, Jacobs JM, Camp DG 2nd, Fang R, Moore RJ, Smith RD, Xiao W, Davis RW, Tompkins RG. (2004) Ultra-high-efficiency strong cation exchange LC/RPLC/MS/MS for high dynamic range characterization of the human plasma proteome. *Anal Chem.* 76(4):1134-44.
- Shi Y, Han Y, Wang X, Zhao Y, Ning X, Xiao B, Fan D. (2002) MGr1-Ag is associated with multidrug-resistant phenotype of gastric cancer cells. *Gastric Cancer.* 5(3):154-9.
- Shilov IV, Seymour SL, Patel AA, Loboda A, Tang WH, Keating SP, Hunter CL, Nuwaysir LM, Schaeffer DA, *et al.* (2007) The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics.* 6(9):1638-1655.
- Siddik ZH. (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 22(47):7265-79.
- Sihlbom C, Kanmert I, von Bahr H, Davidsson P. (2008) Evaluation of the combination of bead technology with SELDI-TOF-MS and 2-D DIGE for detection of plasma proteins. *Journal of Proteome Research.* 7(9):4191-4198.
- Silverman-Gavrila RV, Silverman-Gavrila LB. (2008) Septins: new microtubule interacting partners. *ScientificWorldJournal.* 8:611-20.
- Sixt SU, Dahlmann B. (2008) Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - incidence and relevance. *Biochim Biophys Acta.* 1782(12):817-23.
- Sklan EH, Podoly E, Soreq H. (2006) RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 78(2):117-34.
- Skvortsov S, Schäfer G, Stasyk T, Fuchsberger C, Bonn GK, Bartsch G, Klocker H, Huber LA. (2011) Proteomics profiling of microdissected low- and high-grade prostate tumors identifies lamin a as a discriminatory biomarker. *J Proteome Res.* 10(1):259-68.
- Smith FR, Raz A, Goodman DS. (1970) Radioimmunoassay of human plasma retinol-binding protein. *The Journal of Clinical Investigation.* 9:1754-1761.
- Song X, Bandow J, Sherman J, *et al.* (2008) iTRAQ experimental design for plasma biomarker discovery. *Journal of Proteome Research.* 7(7):2952-2958.
- Spiro RG. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 12(4):43R-56R.
- Stahl-Zeng J, Lange V, Ossola R, Eckhardt K, Krek W, Aebersold R, Domon B. (2007) High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Mol Cell Proteomics.* 6(10):1809-17.

- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H. (2005) Function of alternative splicing. *Gene*. 344:1-20.
- States DJ, Omenn GS, Blackwell TW, Fermin D, Eng J, Speicher DW, Hanash SM. (2006) Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. *Nat Biotechnol*. 24(3):333-8.
- Sumizawa T, Igisu H. (2009) Suppression of acrylamide toxicity by carboxyfullerene in human neuroblastoma cells in vitro. *Arch Toxicol*. 83(9):817-24.
- Sun L, Shi Y, Guo C, Yao L, Lin T, Du J, Han Q, Han Y, Fan D. (2006) Regulation of multidrug resistance by MGr1-antigen in gastric cancer cells. *Tumour Biol*. 27(1):27-35.
- Sun W, Kim H. (2007) Neurotrophic roles of the beta-thymosins in the development and regeneration of the nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 1112:210-8.
- Surinova S, Schiess R, Hüttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. (2011) On the development of plasma protein biomarkers. *J Proteome Res*. 10(1):5-16.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397(6718):441-6.
- Susuki K, Rasband MN. (2008) Spectrin and ankyrin-based cytoskeletons at polarized domains in myelinated axons. *Exp Biol Med (Maywood)*. 233(4):394-400.
- Svensen CB, Hummelshøj T, Munthe-Fog L, *et al.* (2008) Ficolins and mannose-binding lectin in danish patients with sarcoidosis. *Respiratory Medicine*. 102(9):1237-1242.
- Swaney DL, Wenger CD, Coon JJ. (2010) Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *J Proteome Res*. 9(3):1323-9.
- Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ. (2006) Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neurotoxicology*. 27(6):992-1002.
- Tabatabaie L, de Koning TJ, Geboers AJ, van den Berg IE, Berger R, Klomp LW. (2009) Novel mutations in 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) are distributed throughout the protein and result in altered enzyme kinetics. *Hum Mutat*. 30(5):749-56.
- Tabb DL, Vega-Montoto L, Rudnick PA, Variyath AM, Ham AJ, Bunk DM, Kilpatrick LE *et al.* (2010) Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 9(2):761-76.
- Tammen H, Schulte I, Hess R, *et al.* (2005) Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. *Proteomics*. 5(13):3414-3422.
- Tan HT, Tan S, Lin Q, Lim TK, Hew CL, Chung MC. (2008) Quantitative and temporal proteome analysis of butyrate-treated colorectal cancer cells. *Mol Cell Proteomics*. 7(6):1174-85.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. (1988) Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2(8):151-3.
- Tanaka Y, Akiyama H, Kuroda T, *et al.* (2006) A novel approach and protocol for discovering extremely low-abundance proteins in serum. *Proteomics*. 6(17):4845-4855.
- Teicher BA. (2008) Newer cytotoxic agents: attacking cancer broadly. *Clin Cancer Res*. 14(6):1610-7.

Teng PN, Bateman NW, Hood BL, Conrads TP. (2010) Advances in proximal fluid proteomics for disease biomarker discovery. *J Proteome Res.* 9(12):6091-100.

Thakker-Varia S, Alder J. (2009) Neuropeptides in depression: role of VGF. *Behav Brain Res.* 197(2):262-78.

Theiss AL, Vijay-Kumar M, Obertone TS, Jones DP, Hansen JM, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. (2009) Prohibitin is a novel regulator of antioxidant response that attenuates colonic inflammation in mice. *Gastroenterology.* 137(1):199-208.

Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. (2009) Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics.* 9(6):1451-68.

Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AK, Hamon C. (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem.* 75(8):1895-904.

Thon JN, Schubert P, Duguay M, Serrano K, Lin S, Kast J, Devine DV. (2008) Comprehensive proteomic analysis of protein changes during platelet storage requires complementary proteomic approaches. *Transfusion.* 48(3):425-35.

Thulasiraman V, Lin S, Gheorghiu L, Lathrop J, Lomas L, Hammond D, Boschetti E. (2005) Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis.* 26(18):3561-71.

Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. (2003) Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2(10):1096-103.

Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijk JM. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(3):515-47.

Todd RC, Lippard SJ. (2009) Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics.* 1(4):280-91.

Tournigand C, de Gramont A. (2006) [Reflexion on a good strategy of use of oxaliplatin with 5-fluorouracil and its derivatives in patients with advanced colorectal cancer]. *Bull Cancer.* 93 Suppl 1:S11-5.

Turunen O, Wahlström T, Vaheri A. (1994) Ezrin has a COOH terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol.* 126:1445-1453.

Ueda K, Takami S, Saichi N, Daigo Y, Ishikawa N, Kohno N, Katsumata M, Yamane A, Ota M, Sato TA, Nakamura Y, Nakagawa H. (2010) Development of serum glycoproteomic profiling technique; simultaneous identification of glycosylation sites and site-specific quantification of glycan structure changes. *Mol Cell Proteomics.* 9(9):1819-28.

Umar A, Kang H, Timmermans AM, Look MP, Meijer-van Gelder ME, den Bakker MA, Jaitly N, Martens JW, Luider TM, Foekens JA, Pasa-Tolić L. (2009) Identification of a putative protein profile associated with tamoxifen therapy resistance in breast cancer. *Mol Cell Proteomics.* 8(6):1278-94.

Unlü M, Morgan ME, Minden JS. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 18(11):2071-7.

VanGuilder HD, Bixler GV, Kutzler L, Brucklacher RM, Bronson SK, Kimball SR, Freeman WM. (2011) Multi-modal proteomic analysis of retinal protein expression alterations in a rat model of diabetic retinopathy. *PLoS One.* 6(1):e16271.

Venkatachalam K, Montell C. (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 76:387-417.

- Villa D, Miloso M, Nicolini G, Rigolio R, Villa A, Cavaletti G, Tredici G. (2005) Low-dose cisplatin protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells from paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 4:1439-1447.
- Virok DP, Simon D, Bozso Z, Rajko R, Datki Z, Balint E, Szegedi V, Janaky T, Penke B, Fulop L. (2011) Protein array based interactome analysis of amyloid-beta indicates an inhibition of protein translation. *J Proteome Res.* [Epub ahead of print].
- Visintin I, Feng Z, Longton G, Ward DC, Alvero AB, Lai Y, Tenthorey J, Leiser A, Flores-Saaib R, Yu H, Azori M, Rutherford T, Schwartz PE, Mor G. (2008) Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 14(4):1065-72.
- von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B. (2003) STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res.* 31(1):258-61.
- Vos MJ, Hageman J, Carra S, Kampinga HH. (2008) Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry.* 47(27):7001-11.
- Wader KF, Fagerli UM, Holt RU, Stordal B, Borset M, Sundan A, Waage A. (2008) Elevated serum concentrations of activated hepatocyte growth factor activator in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 81:380-383.
- Walther TC, Mann M. (2010) Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* 190(4):491-500.
- Wang ZG, Sheluho D, Gatti DL, Ackerman SH. (2000) The alpha-subunit of the mitochondrial F(1) ATPase interacts directly with the assembly factor Atp12p. *EMBO J.* 19(7):1486-93.
- Wang YY, Cheng P, Chan DW. (2003) A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis. *Proteomics.* 3(3):243-248.
- Wang D, Lippard SJ. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 4(4):307-20.
- Wang Y, Wang W, Wang S, Wang J, Shao S, Wang Q. (2008) Down-regulation of GRP78 is associated with the sensitivity of chemotherapy to VP-16 in small cell lung cancer NCI-H446 cells. *BMC Cancer.* 8:372.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 16(7):1090-4.
- WenQiang T, Yi G, Yu S, Jung T, DaYe S. (1997) Extracellular calmodulin-binding proteins in body fluids of animals. *J Endocrinol.* 155(1):13-7.
- Weston AD, Hood L. (2004) Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J Proteome Res.* 3(2):179-96.
- Whiteaker JR, Zhao L, Anderson L, Paulovich AG. (2010) An automated and multiplexed method for high throughput peptide immunoaffinity enrichment and multiple reaction monitoring mass spectrometry-based quantification of protein biomarkers. *Mol Cell Proteomics.* 9(1):184-96.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 13:19-50.
- Wilm M. (2009) Quantitative proteomics in biological research. *Proteomics.* 9(20):4590-605.

- Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C. (2008) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *Eur J Cancer*. 44(11):1507-15.
- Wolters DA, Washburn MP, Yates JR 3rd. (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*. 73(23):5683-90.
- Wright GL Jr. (2002) SELDI proteinchip MS: a platform for biomarker discovery and cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2(6):549-63.
- Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Matthews DE, Yates JR 3rd. (2004) Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis. *Anal Chem*. 76(17):4951-9.
- Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. (2006) Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, iCAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res*. 5(3):651-8.
- Wu CC, Hsu CW, Chen CD, Yu CJ, Chang KP, Tai DI, Liu HP, Su WH, Chang YS, Yu JS. (2010) Candidate serological biomarkers for cancer identified from the secretomes of 23 cancer cell lines and the human protein atlas. *Mol Cell Proteomics*. 9(6):1100-17.
- Xue H, Lu B, Lai M. (2008) The cancer secretome: a reservoir of biomarkers. *J Transl Med*. 6:52.
- Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ. (2006) Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res*. 12(19):5817-25.
- Yang RZ, Lee MJ, Hu H, *et al.* (2006) Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *American Journal of Physiology*. 290:E1253–E1261.
- Yang W, Cai Q, Lui VW, Everley PA, Kim J, Bhola N, Quesnelle KM, Zetter BR, Steen H, Freeman MR, Grandis JR. (2010) Quantitative proteomics analysis reveals molecular networks regulated by epidermal growth factor receptor level in head and neck cancer. *J Proteome Res*. 9(6):3073-82.
- Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C. (2001) Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal Chem*. 73(13):2836-42.
- Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 11:49-79.
- Yocum AK, Yu K, Oe T, Blair IA. (2005) Effect of immunoaffinity depletion of human serum during proteomic investigations. *J Proteome Res*. 4(5):1722-31.
- Yoo JS, Moyer BD, Bannykh S, Yoo HM, Riordan JR, Balch WE. (2002) Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem*. 277(13):11401-9.
- Zhai L, Kita K, Wano C, Wu Y, Sugaya S, Suzuki N. (2005) Decreased cell survival and DNA repair capacity after UVC irradiation in association with down-regulation of GRP78/BiP in human R5a cells. *Exp Cell Res*. 305(2):244-52.
- Zhang R, Sioma CS, Thompson RA, Xiong L, Regnier FE. (2002) Controlling deuterium isotope effects in comparative proteomics. *Anal Chem*. 74(15):3662-9.
- Zhang H, Li XJ, Martin DB, Aebersold R. (2003) Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 21(6):660-6.
- Zhang Z, Chan DW. (2010) The Road from Discovery to Clinical Diagnostics: Lessons Learned From the First FDA cleared In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay of Proteomic Biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 19(12):2995-9.

Zhang Q, Faca V, Hanash S. (2011) Mining the plasma proteome for disease applications across seven logs of protein abundance. *J Proteome Res.* 10(1):46-50.

Zhao L, Lee BY, Brown DA, Molloy MP, Marx GM, Pavlakis N, Boyer MJ *et al.* (2009) Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling. *Cancer Res.* 69(19):7696-703.

Zhao Y, Jia W, Sun W, Jin W, Guo L, Wei J, Ying W, Zhang Y, Xie Y, Jiang Y, He F, Qian X. (2010) Combination of improved (18)O incorporation and multiple reaction monitoring: a universal strategy for absolute quantitative verification of serum candidate biomarkers of liver cancer. *J Proteome Res.* 9(6):3319-27.

Zheng GX, Wang CX, Qu X, Deng XM, Deng BP, Zhang J. (2006) Establishment of serum protein pattern for screening colorectal cancer using SELDI-TOF-MS. *Exp Oncol.* 28(4):282-7.

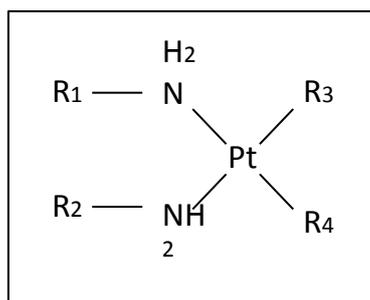
Zhong X, Pittman RN. (2006) Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet.* 15(16):2409-20.

Zhou M, Lucas DA, Chan KC, Issaq HJ, Petricoin EF 3rd, Liotta LA, Veenstra TD, Conrads TP. (2004) An investigation into the human serum "interactome". *Electrophoresis.* 25(9):1289-98.

Zhou C, Cunningham L, Marcus AI, Li Y, Kahn RA. (2006) Arl2 and Arl3 regulate different microtubule-dependent processes. *Mol Biol Cell.* 17(5):2476-87.

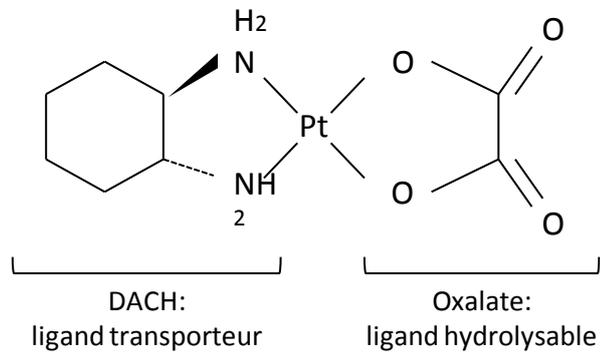
Zhou JY, Afjehi-Sadat L, Asress S, Duong DM, Cudkowicz M, Glass JD, Peng J. (2010) Galectin-3 is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: discovery by a proteomics approach. *J Proteome Res.* 9(10):5133-41.

Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC. (2005) Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics.* 5(13):3304-3313.

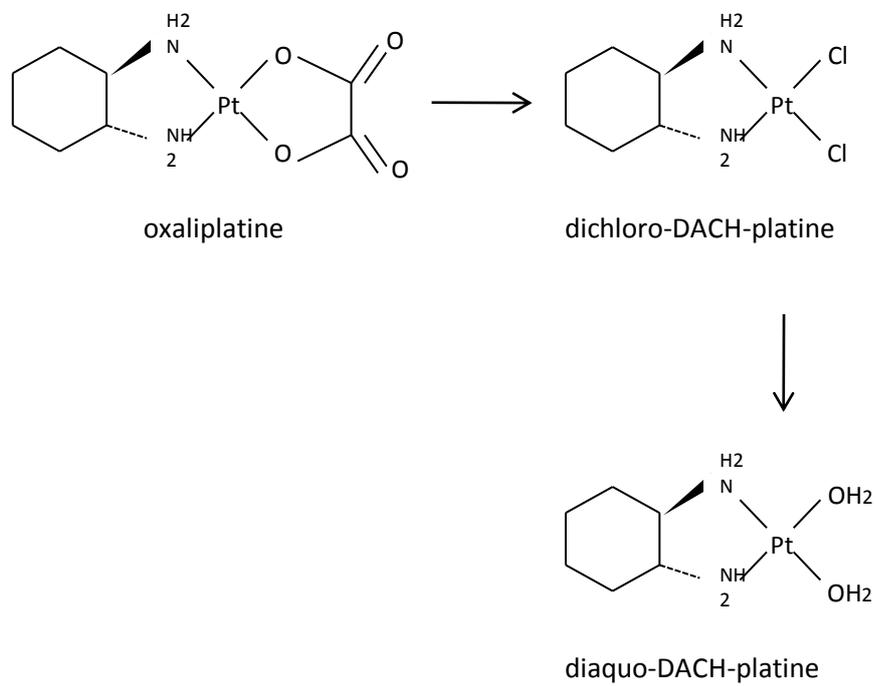


	R1	R2	R3	R4
cisplatine	H	H	Cl	Cl
carboplatine	H	H		
oxaliplatine				

**Figure I-1:** Structures chimiques du cisplatine, du carboplatine et de l'oxaliplatine.



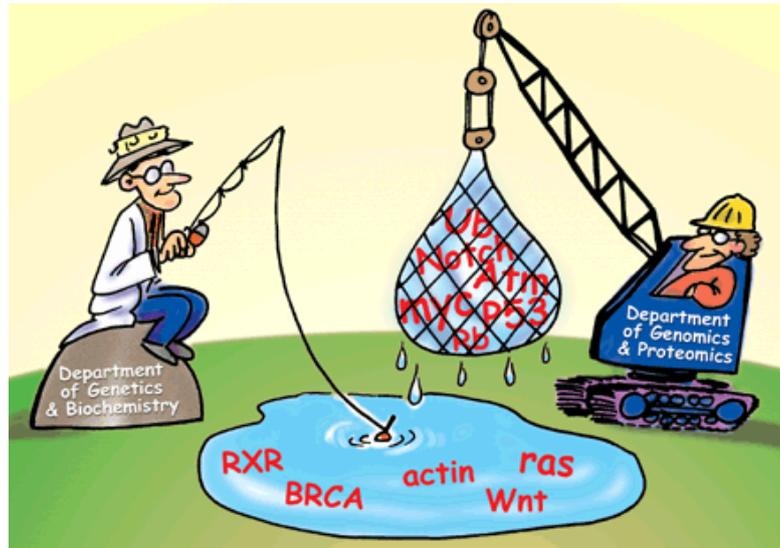
**Figure I-2:** Structure chimique de l'oxaliplatine.



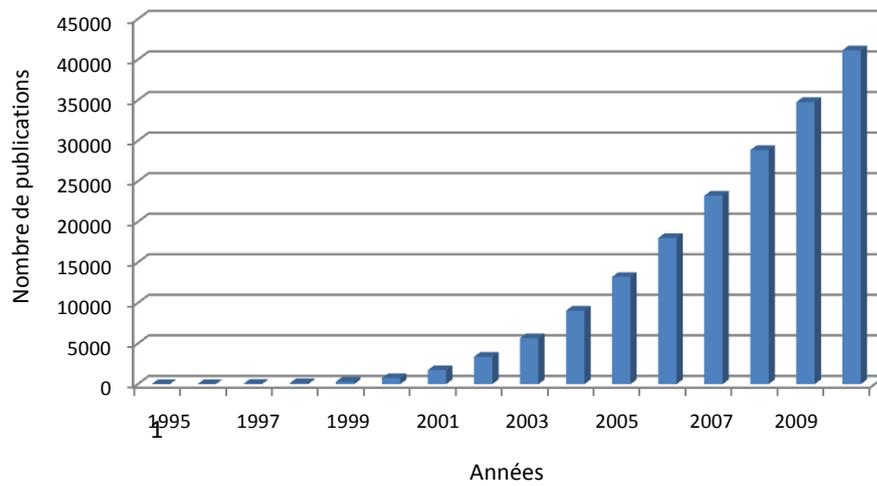
**Figure I-3:** Réactions d'hydrolyse non enzymatique de l'oxaliplatine (Kweekel *et al.*, 2005).

**Tableau I-1:** Correspondance des échelles d'évaluation de la neurotoxicité périphérique de l'oxaliplatine (Gamelin, 2004).

		grade 1	grade 2	grade 3	grade 4
NCI-CTCAE	paresthésies	légères	modérées	sévères	
	sensibilité objective		perte modérée	perte sévère	
	réflexes	abolis			
	déficit moteur	subjectif			paralysie
	retentissement fonctionnel	minime	±	+	
SPECIFIQUE (Levi modifié)	paresthésies, dysesthésies	légères, brèves	modérées, persistantes	sévères, persistantes	
	sensibilité objective	normale	perte modérée	perte sévère	
	retentissement fonctionnel			maladresse, gêne pour écrire	

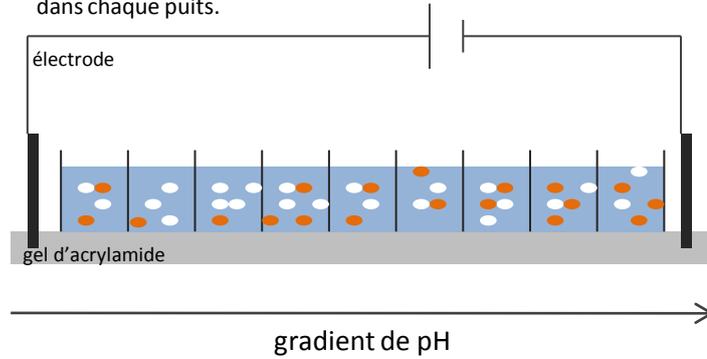


**Figure I-4:** La démarche globaliste des disciplines en -omique imagée par Fields (2001) sous forme d'une expédition de pêche au chalut. Crédit: Joe Sutliff.

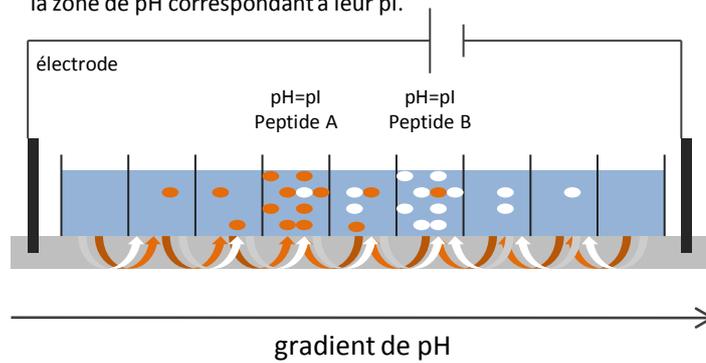


**Figure I-5:** Nombre cumulé de publications parues dans le champ de la protéomique depuis 1995, recherchées dans PubMed à l'aide des termes Proteomics, Proteomic, Proteome.

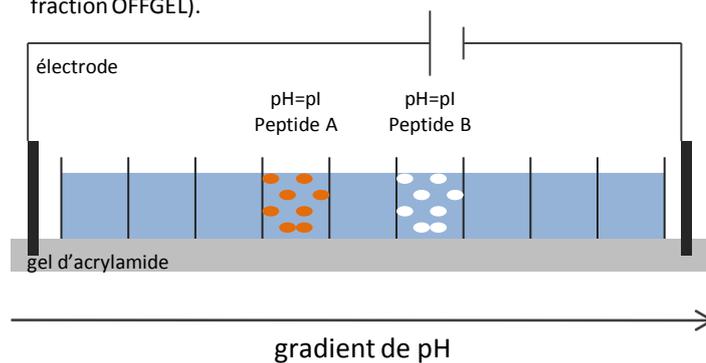
1. Une barrette de puits est apposée à la surface d'une bandelette de gel d'acrylamide au sein duquel est ménagé un gradient de pH. Un volume de l'échantillon peptidique (ou protéique) est déposé dans chaque puits.



2. Sous l'effet du champ électrique, les peptides se déplacent vers la zone de pH correspondant à leur pI.

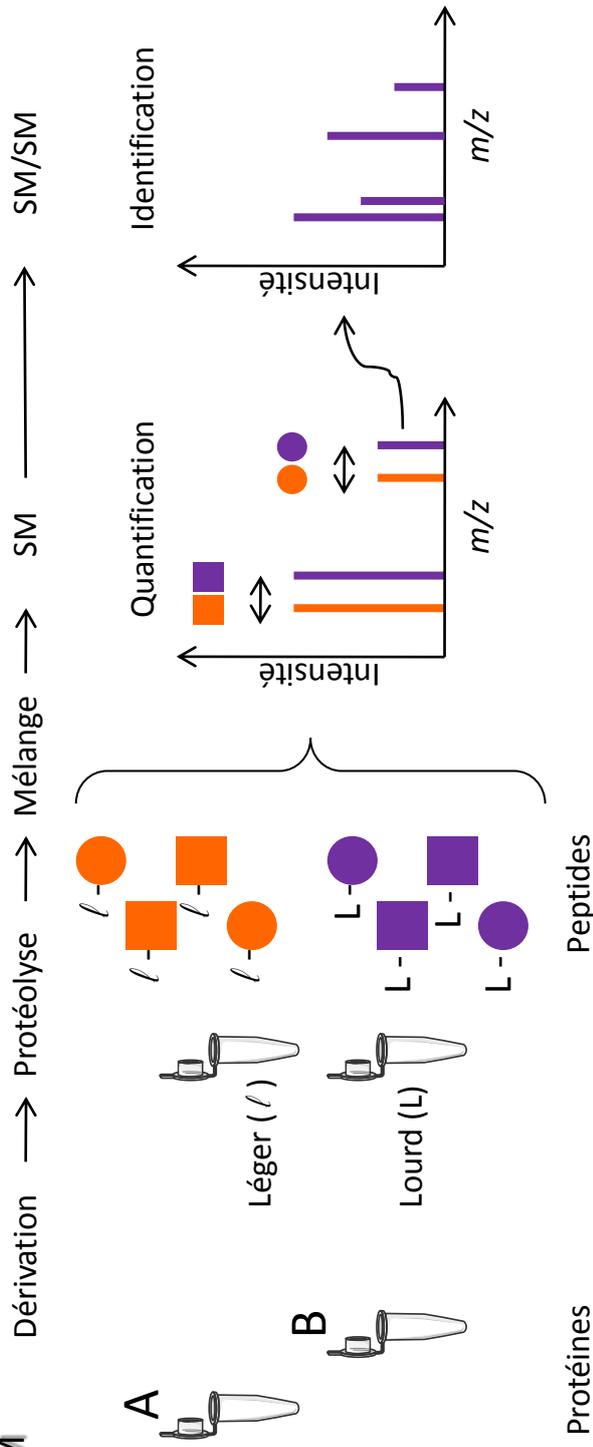


3. Un même peptide est ainsi concentré dans un même puits (une fraction OFFGEL).

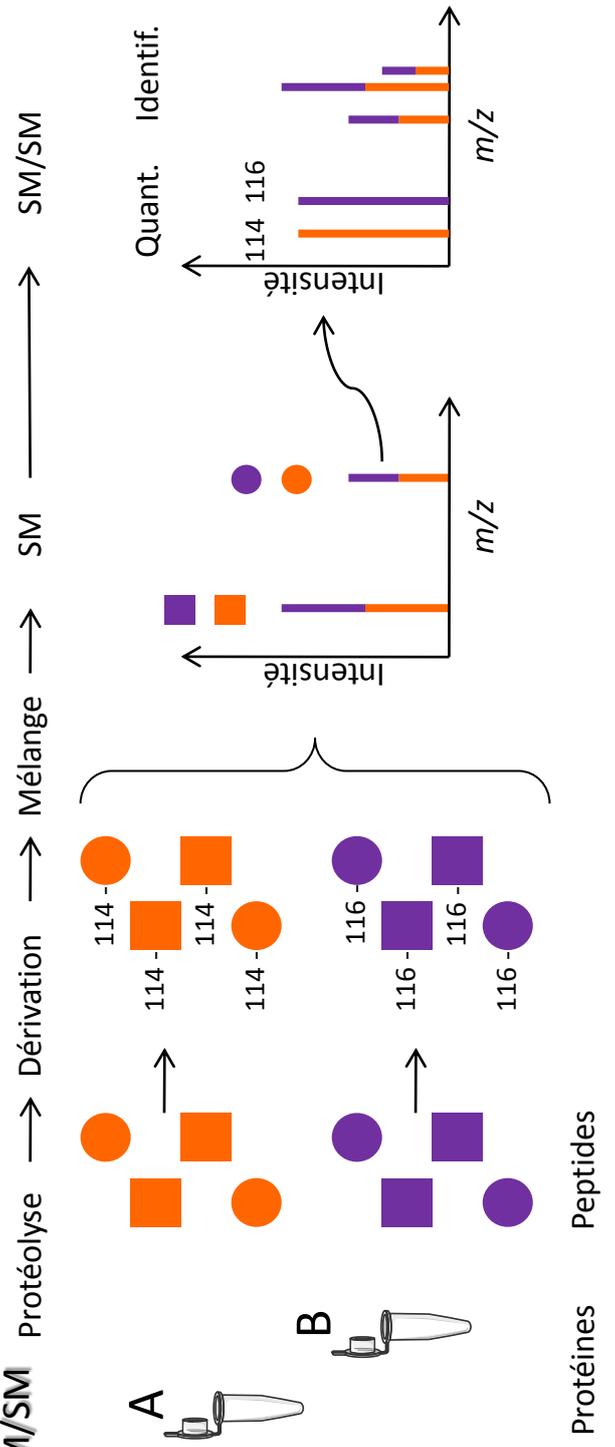


**Figure I-6:** Principe de la technologie de fractionnement par IEF-OFFGEL.

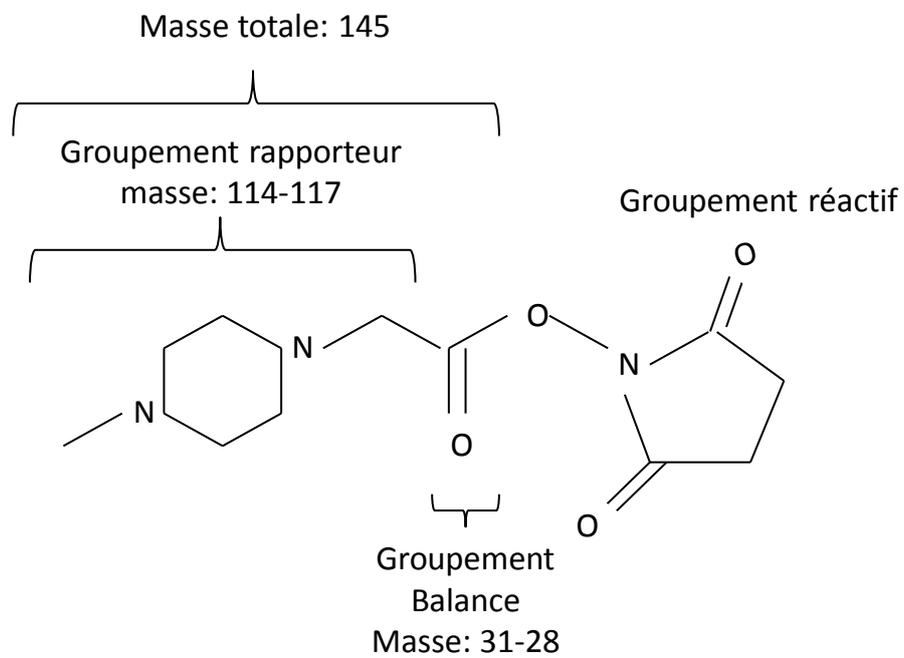
**Marquage des protéines  
Quantification en SM  
ICAT, ICPL**



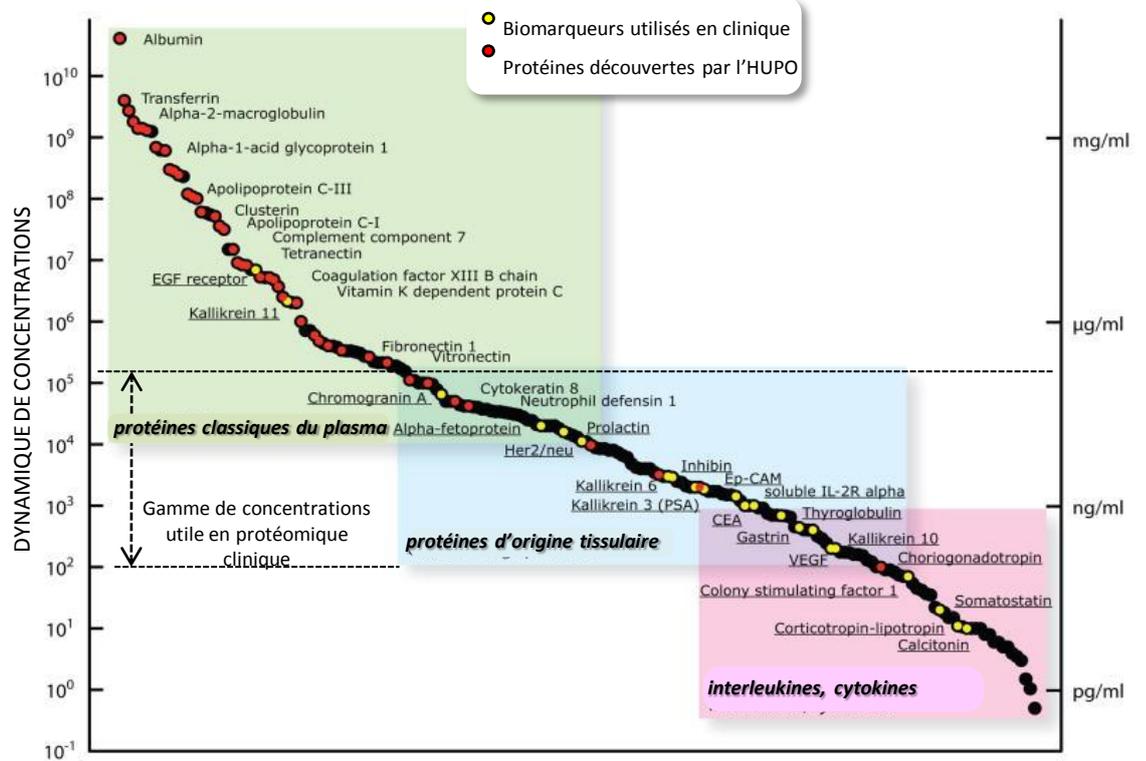
**Marquage des peptides  
Quantification en SM/SM  
iTRAQ, TMT**



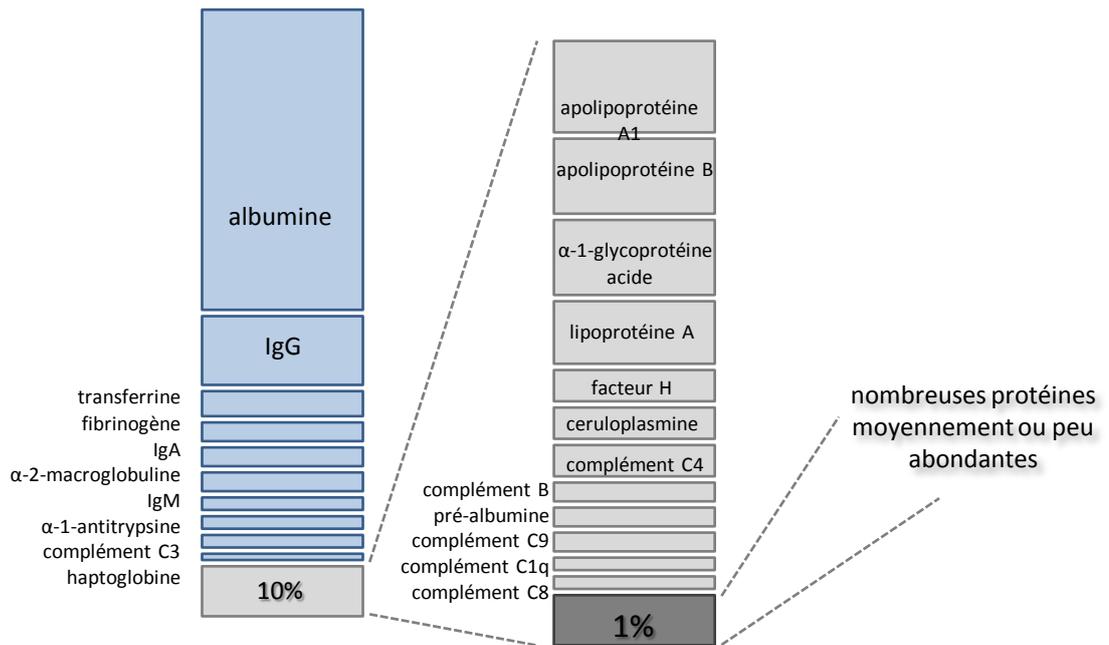
**Figure I-7:** Représentation schématique des méthodes de quantification relative par spectrométrie de masse, par marquage chimique.



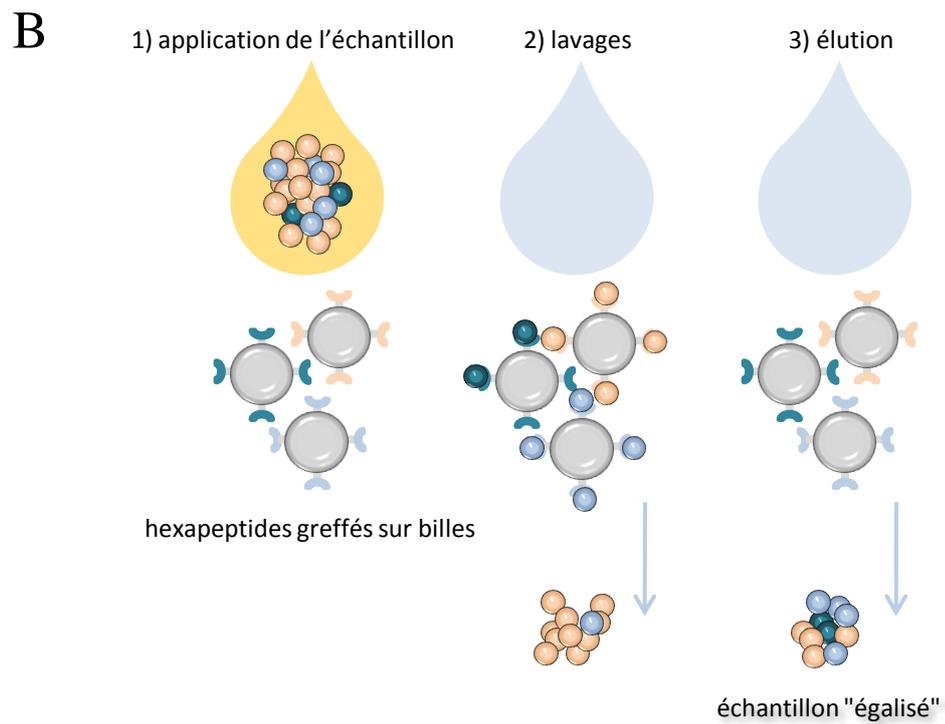
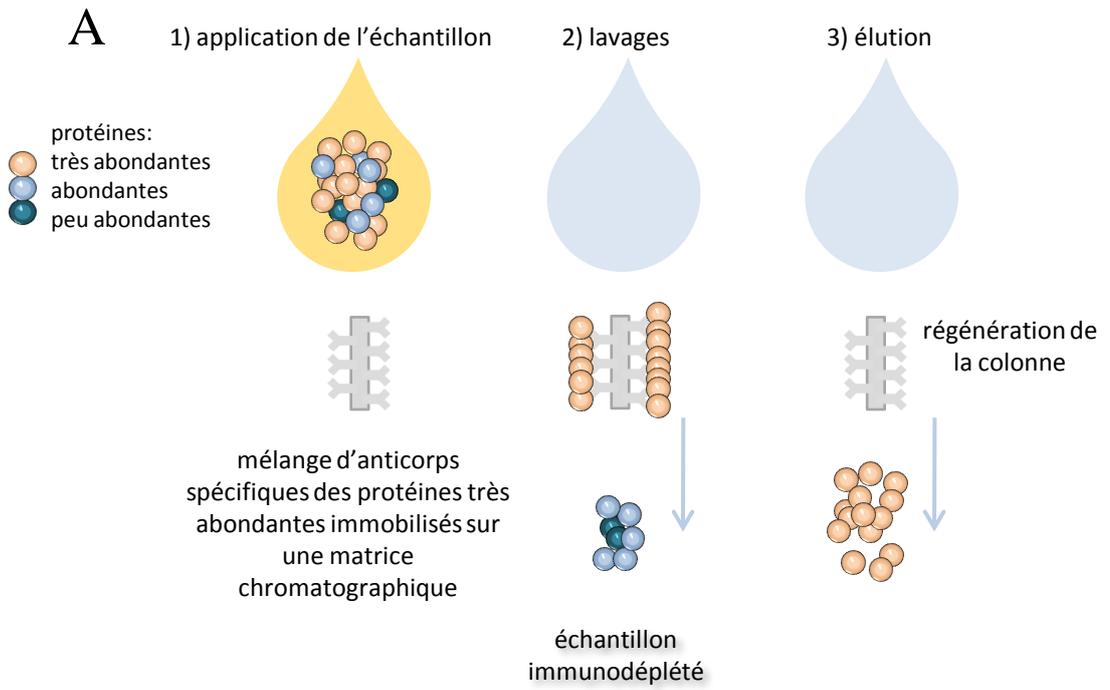
**Figure I-8:** Structure chimique du réactif iTRAQ (4-plex).



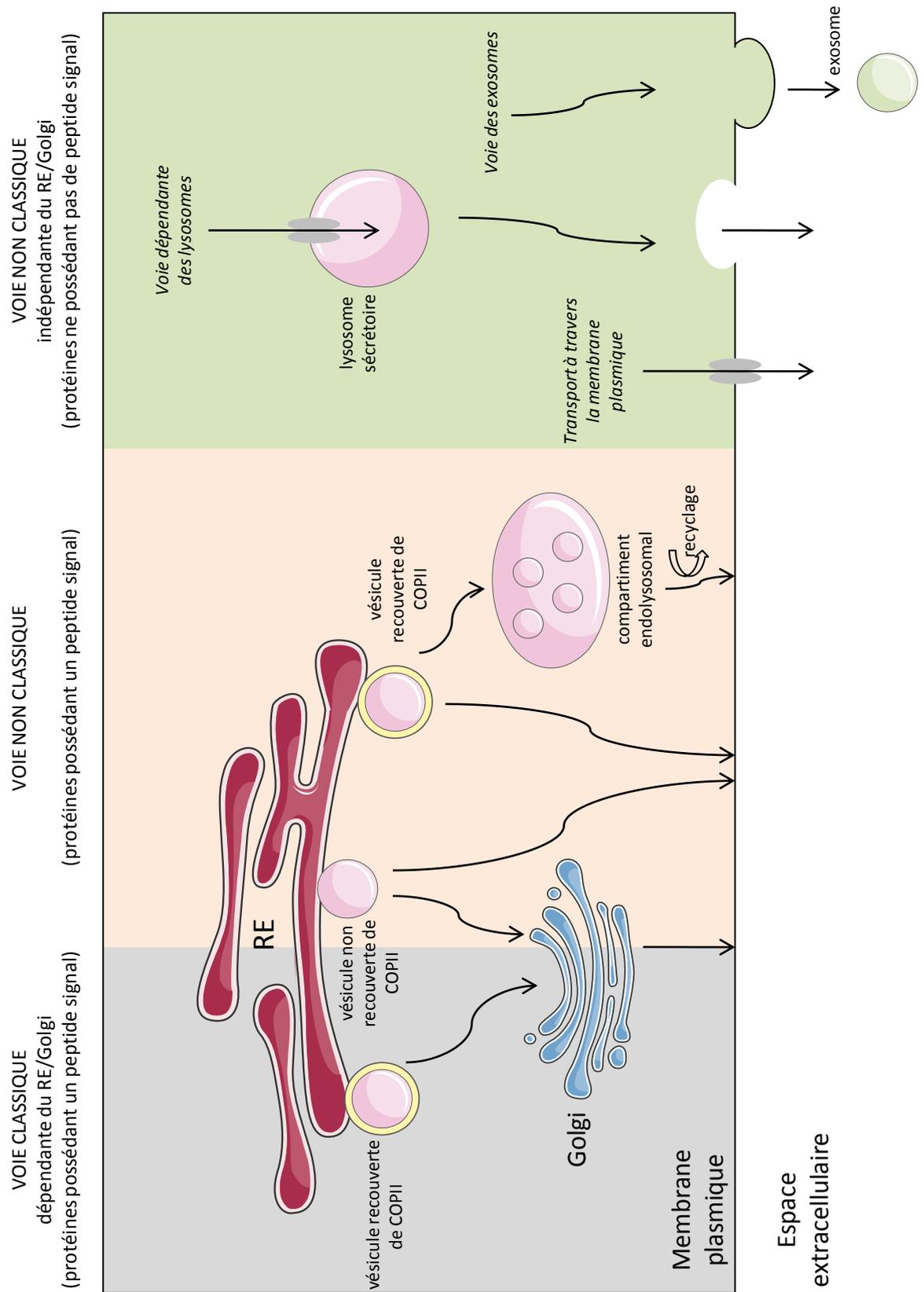
**Figure I-9:** Distribution en fonction de leur concentration selon Anderson and Anderson (2002) des protéines plasmatiques en 3 groupes, les protéines classiques du plasma, les protéines d'origine tissulaire et les interleukines/cytokines. Sont indiquées en rouge les protéines ayant été identifiées grâce au projet sur le protéome plasmatique humain (PPP: Plasma Proteome Project) piloté par l'HUPO (States *et al.*, 2006) et en jaune les biomarqueurs protéiques utilisés en clinique (Anderson, 2010). Adapté de Service (2008).



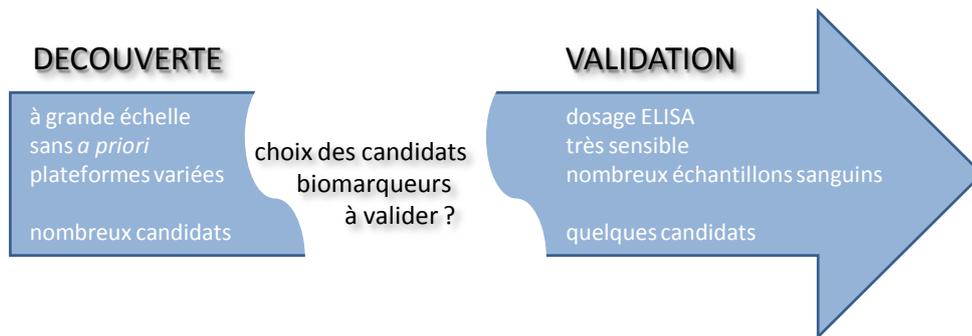
**Figure I-10:** Diagramme présentant la contribution relative des protéines dans le plasma sanguin. Seules 22 protéines constituent environ 99% du contenu protéique du plasma. D'après Tirumalai *et al.* (2003).



**Figure I-11:** Principe des stratégies visant à diminuer la dynamique de concentrations du protéome plasmatique: l'immunodéplétion (A) et l'"égalisation" en utilisant la technologie Equalizer (B).



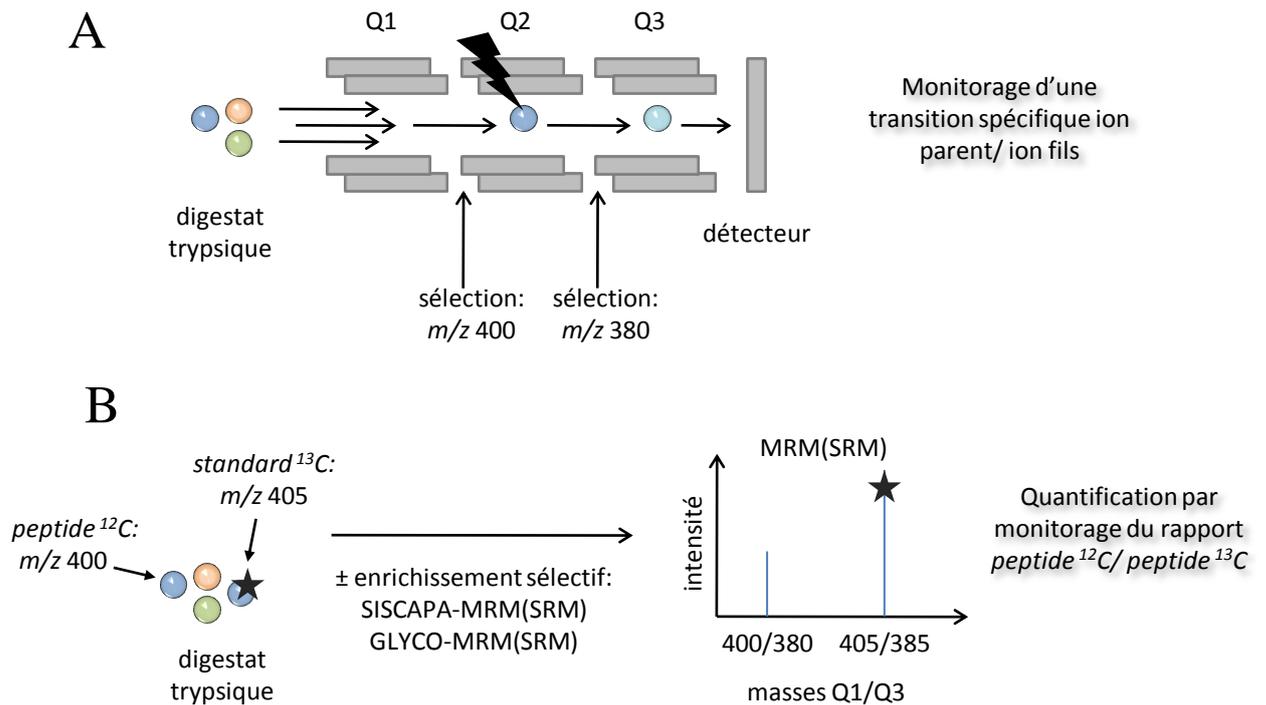
**Figure I-12:** Les 3 grandes voies de sécrétion des protéines selon Nickel and Rabouille (2009).



**Figure I-13:** Fossé technologique ralentissant le processus de développement d'un biomarqueur.

	Phase	Type d'échantillons	Méthodologie	Nombre d'analytes	Nombre d'éch.	Issue	
Développement pré-clinique	I-Découverte	fluides proximaux tissus microdisséqués modèles animaux milieux conditionnés	Approche différentielle à grande échelle Plateformes variées	1000s	~10	~100 candidats biomarqueurs sélectionnés en priorité	non biaisé, semi-quantitatif
	II-Vérification	plasma sanguin cas/contrôle	Approche ciblée MRM(SRM)	~100	~100	~10 biomarqueurs vérifiés	quantitatif ciblé
	III-Validation	plasma sanguin étude rétrospective	Immunotest	~10	1000s	panel de biomarqueurs validés	
	Evaluation clinique	plasma sanguin étude prospective					

**Figure I-14:** Processus de développement pré-clinique d'un biomarqueur en 3 phases selon le CPTC (Clinical Proteomic Technologies for Cancer) à l'Institut National du Cancer américain (National Cancer Institute, NCI), où une étape de vérification fait le pont entre la découverte et la validation. D'après Boja *et al.* (2010).



**Figure I-15:** Principe de la quantification ciblée des biomarqueurs par MRM(SRM) (Multiple(Selected) Reaction Monitoring).

A: Principe de la méthode MRM(SRM). Dans le premier quadropôle (Q1) est sélectionné le peptide précurseur de valeur  $m/z$  prédéfinie. Une fois entré dans la chambre de collision (Q2), le peptide est fragmenté et un fragment de valeur  $m/z$  déterminée est sélectionné dans le troisième quadropôle (Q3). De cette façon, si au départ plusieurs précurseurs de même valeur  $m/z$  sont sélectionnés, ce monitoring de la transition Q1-Q3, d'un ion parent spécifique à un ion fils spécifique, assure de la mesure spécifique du peptide ciblé (Lange *et al.*, 2008). Le principe est simple mais ce type de plateforme n'équipe toutefois que quelques laboratoires experts.

B: Principe de la quantification absolue par MRM(SRM)/SID-MS (Multiple(Selected) Reaction Monitoring/Stable Isotope Dilution-Mass Spectrometry) à l'aide d'un peptide standard marqué isotopiquement.

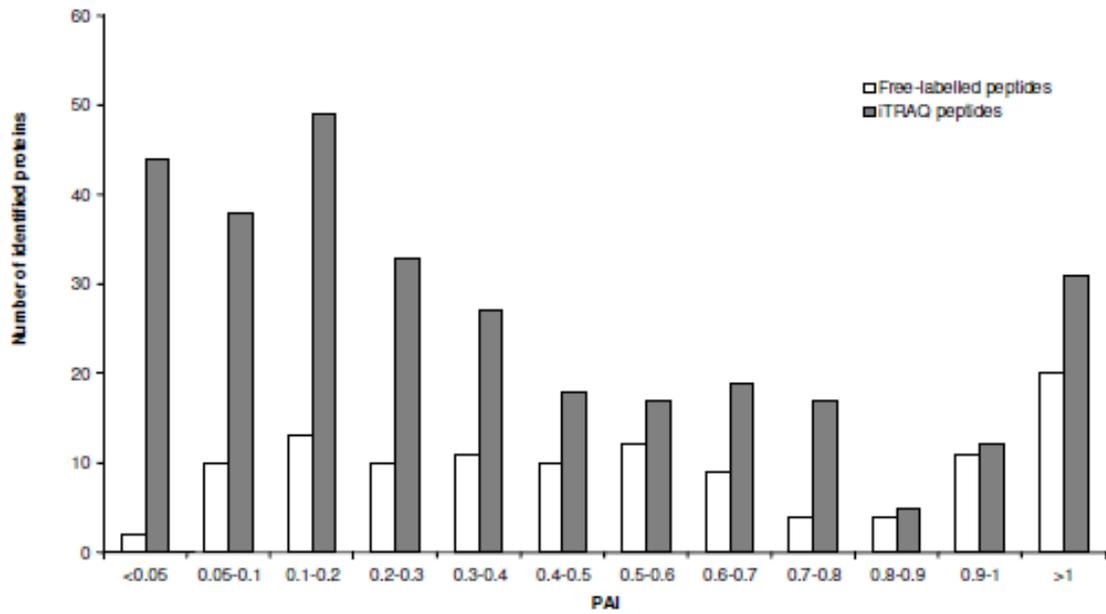


**Tableau R-I:** Liste des expériences, selon que les peptides ont été séparés par SCX ou IEF-OFFGEL, marqués à l'iTRAQ ou non marqués, et nombre de protéines identifiées dans chacune d'elles.

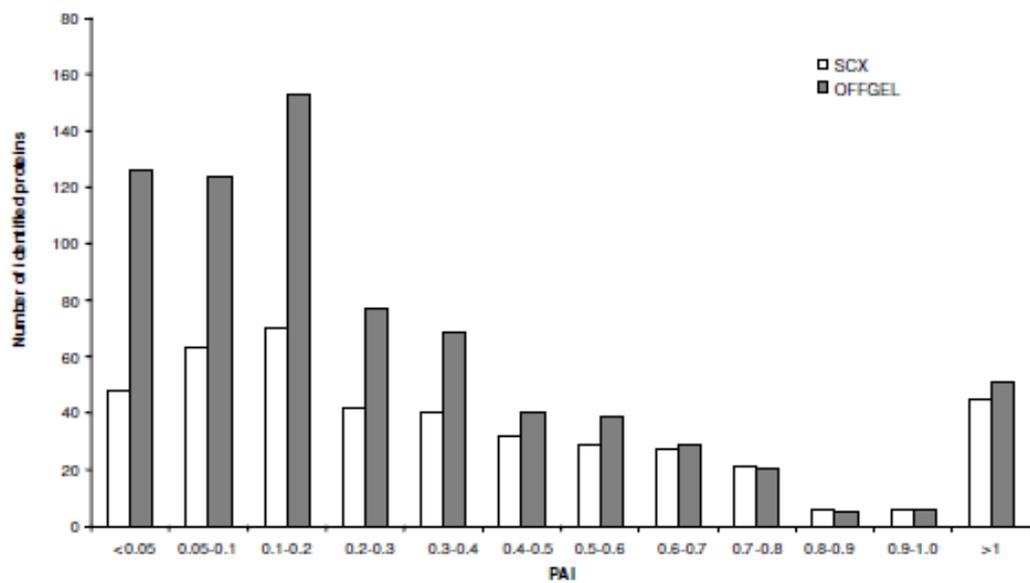
Experiment	Quantity ( $\mu$ g)	Fractionation	Labelling	Total proteins	Proteins with 2 peptides (at least)	Yield (%)
NL-116	200	SCX	no	159	116	73
NL-184	200	OFFGEL-IEF	no	285	184	64
NL-235	200	SCX + OFFGEL-IEF	no	302	235	78
iTRAQ-310	200	SCX	iTRAQ	472	310	66
iTRAQ-429	400	SCX	iTRAQ	492	429	87
iTRAQ-739	400	OFFGEL-IEF	iTRAQ	879	739	84

All experiments: 1111 proteins, with 2 pept: 947 proteins

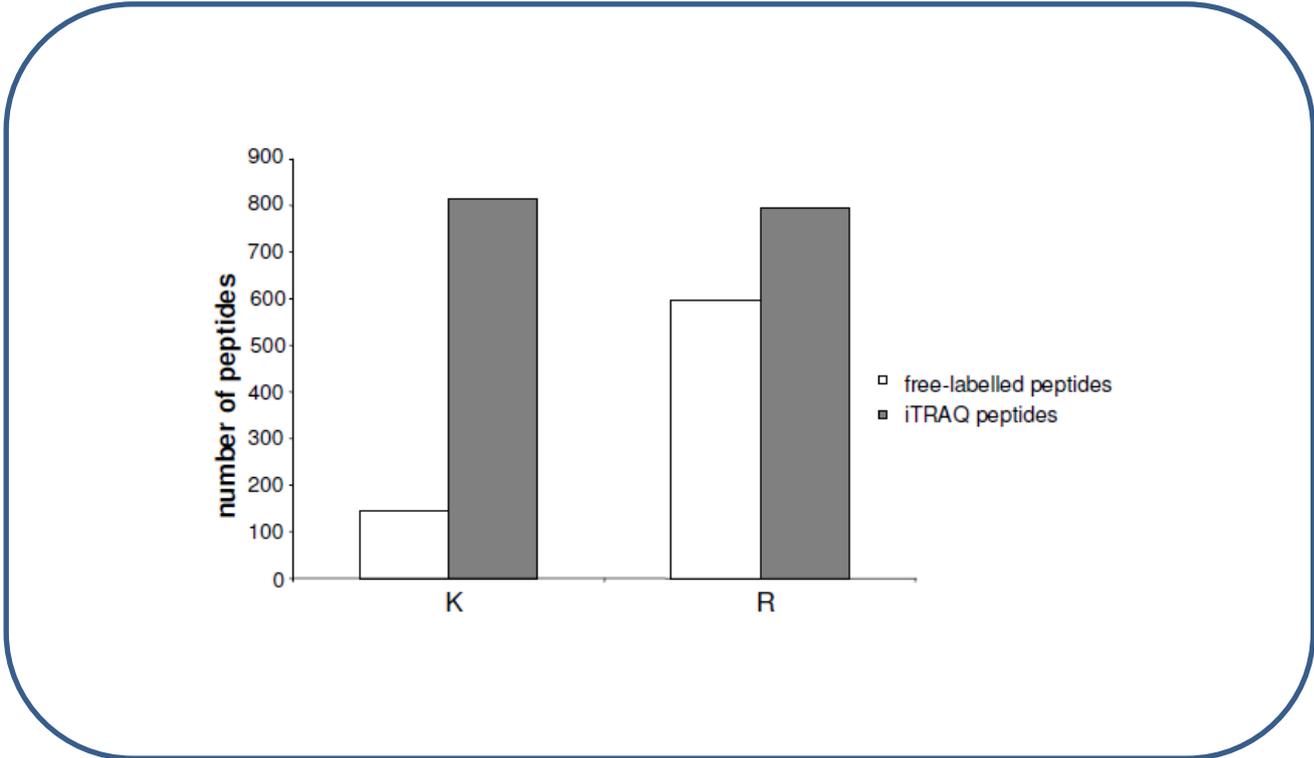
# A



# B

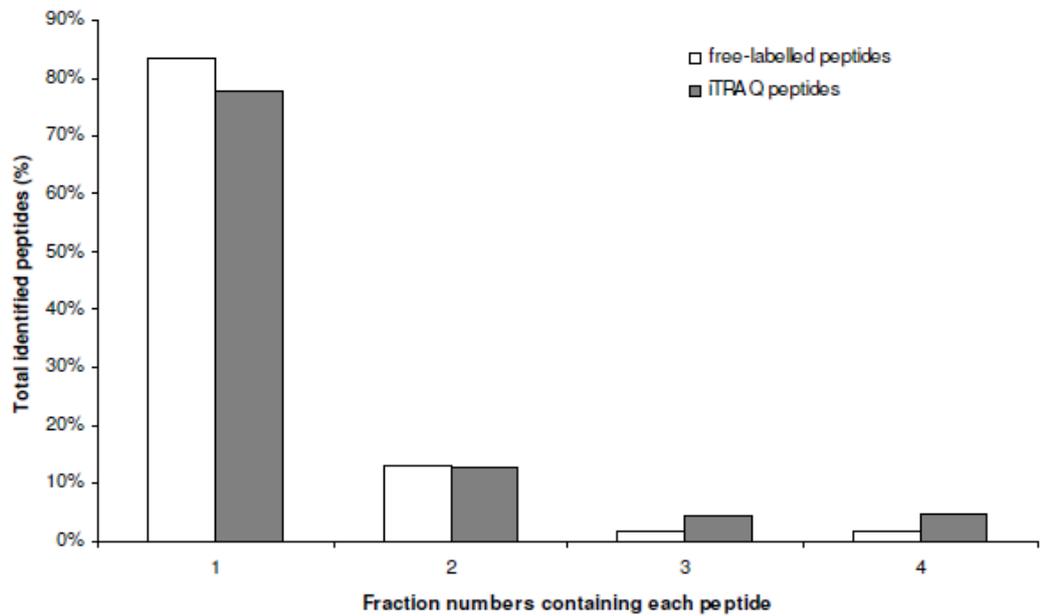


**Figure R-1:** Distribution des protéines identifiées en fonction de leur PAI (Protein Abundance Index).  
**A:** Influence du marquage iTRAQ sur la distribution en fonction de leur PAI des protéines identifiées (200 µg) après fractionnement par SCX.  
**B:** Influence du fractionnement par OFFGEL sur la distribution en fonction de leur PAI des protéines identifiées (400 µg) après marquage iTRAQ.

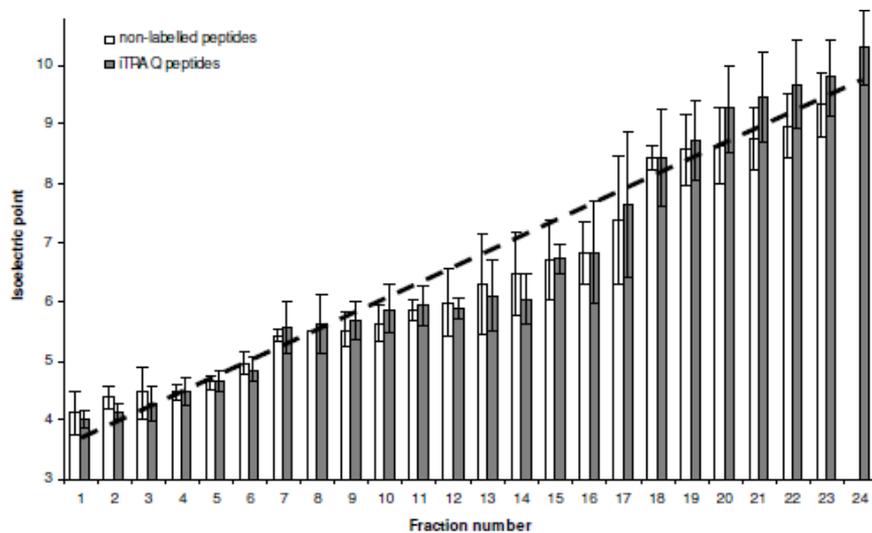


**Figure R-2:** Influence du marquage iTRAQ sur le nombre de peptides identifiés avec une lysine (K) ou une arginine (R) en C-ter.

# A



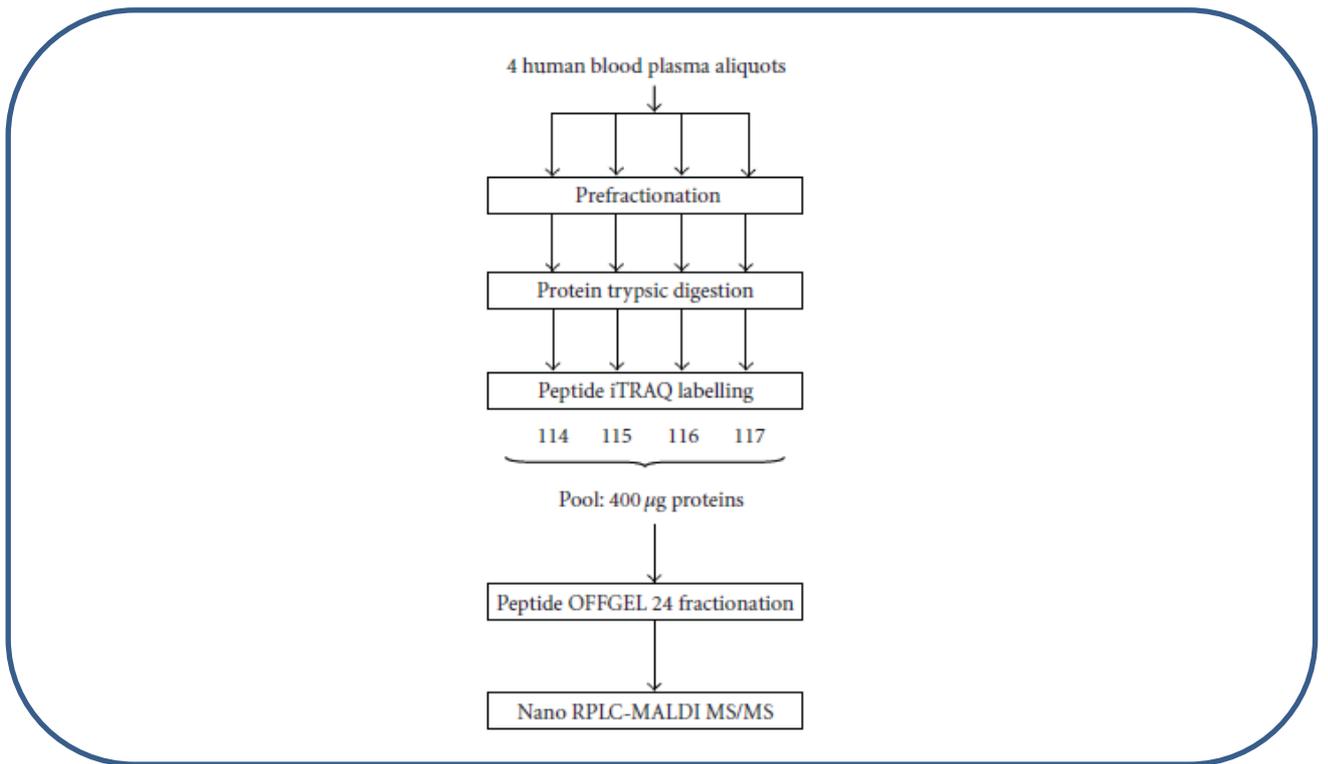
# B



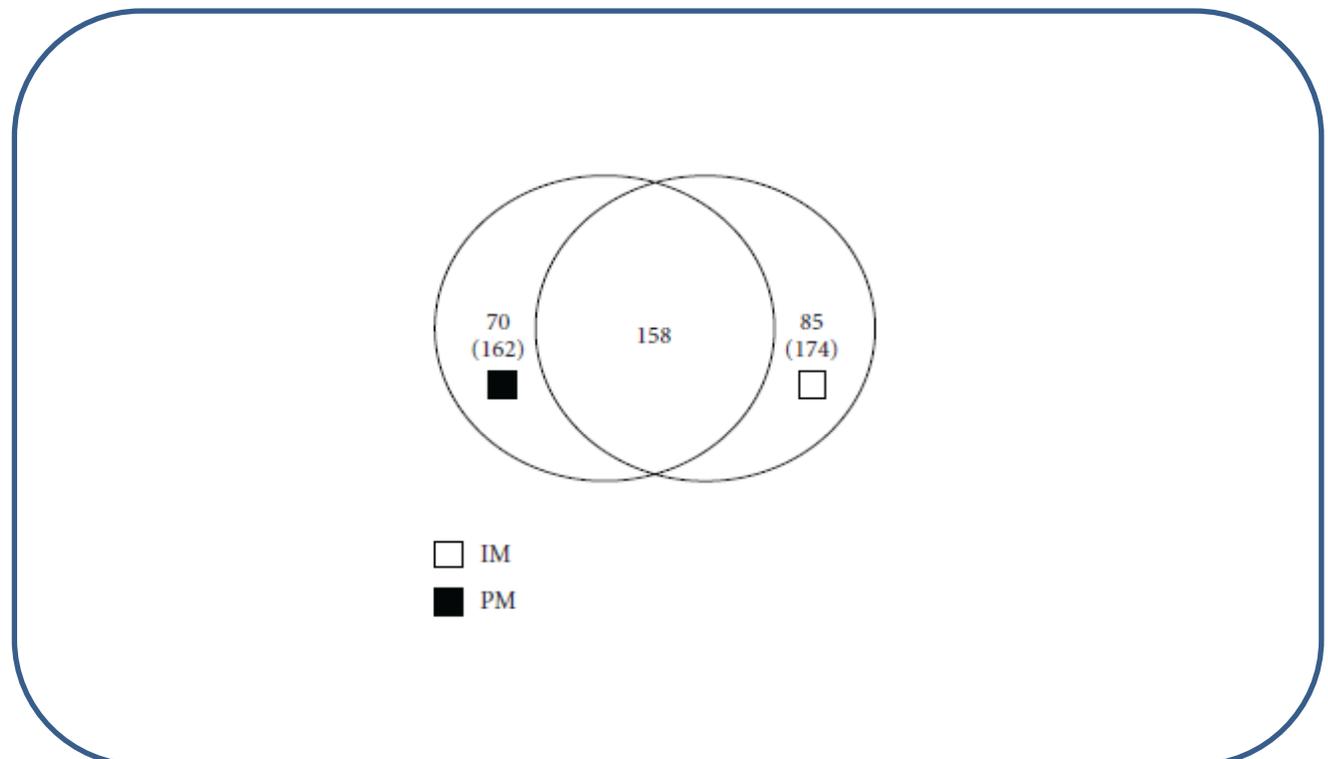
**Figure R-3:** Qualité du fractionnement des peptides marqués à l'iTRAQ par IEF-OFFGEL.

**A:** Distribution des peptides identifiés dans 1, 2, 3 ou 4 fractions OFFGEL.

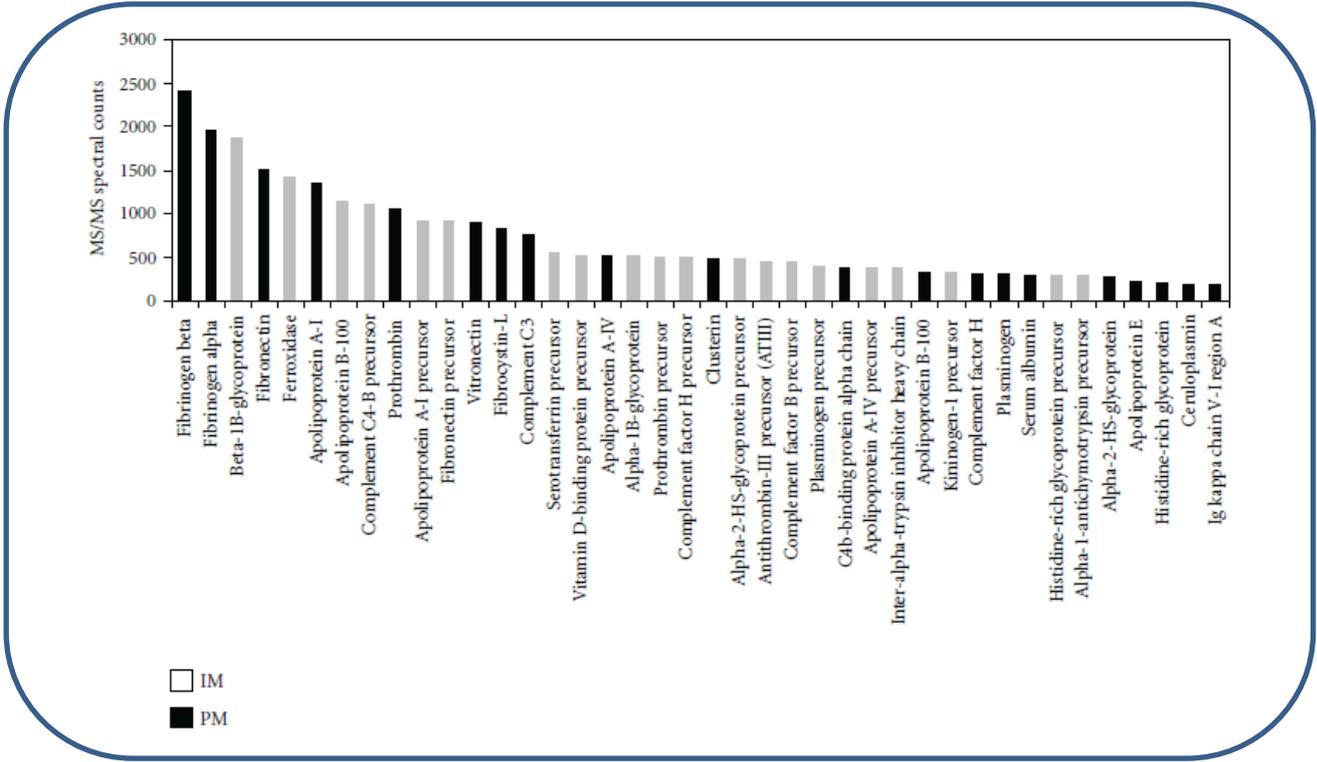
**B:** Analyse du pI moyen des peptides identifiés dans chaque fraction OFFGEL après filtration des identifications faussement positives. La droite représente les valeurs de pH moyen théorique (pH 3-10) de chacune des 24 fractions OFFGEL.



**Figure R-4:** Procédure expérimentale associant marquage iTRAQ / fractionnement OFFGEL / RPLC-MS/MS, suivie pour analyser le protéome plasmatique.



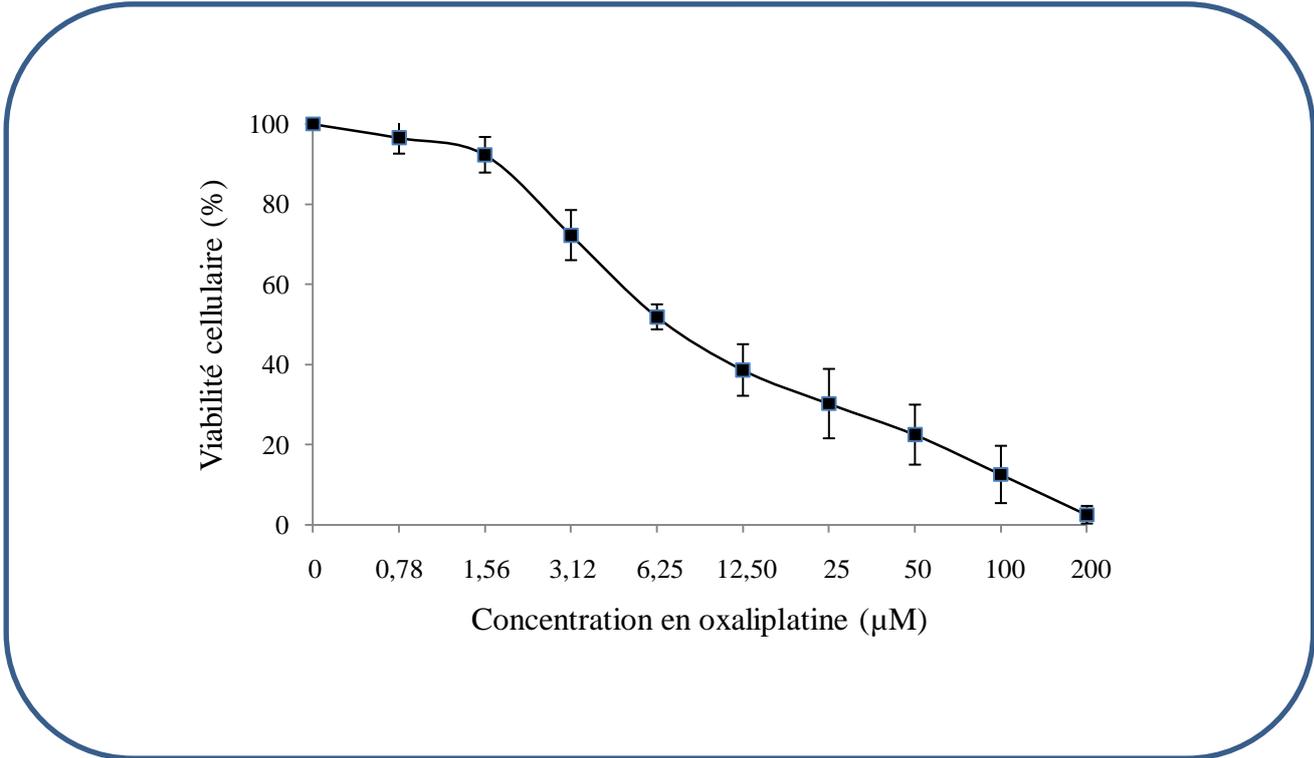
**Figure R-5:** Diagramme de Venn présentant le nombre de protéines identifiées avec au moins 2 peptides (entre parenthèses, avec 1 peptide) dans le plasma après immunodéplétion des protéines abondantes (IM) ou traitement par ProteoMiner (PM).



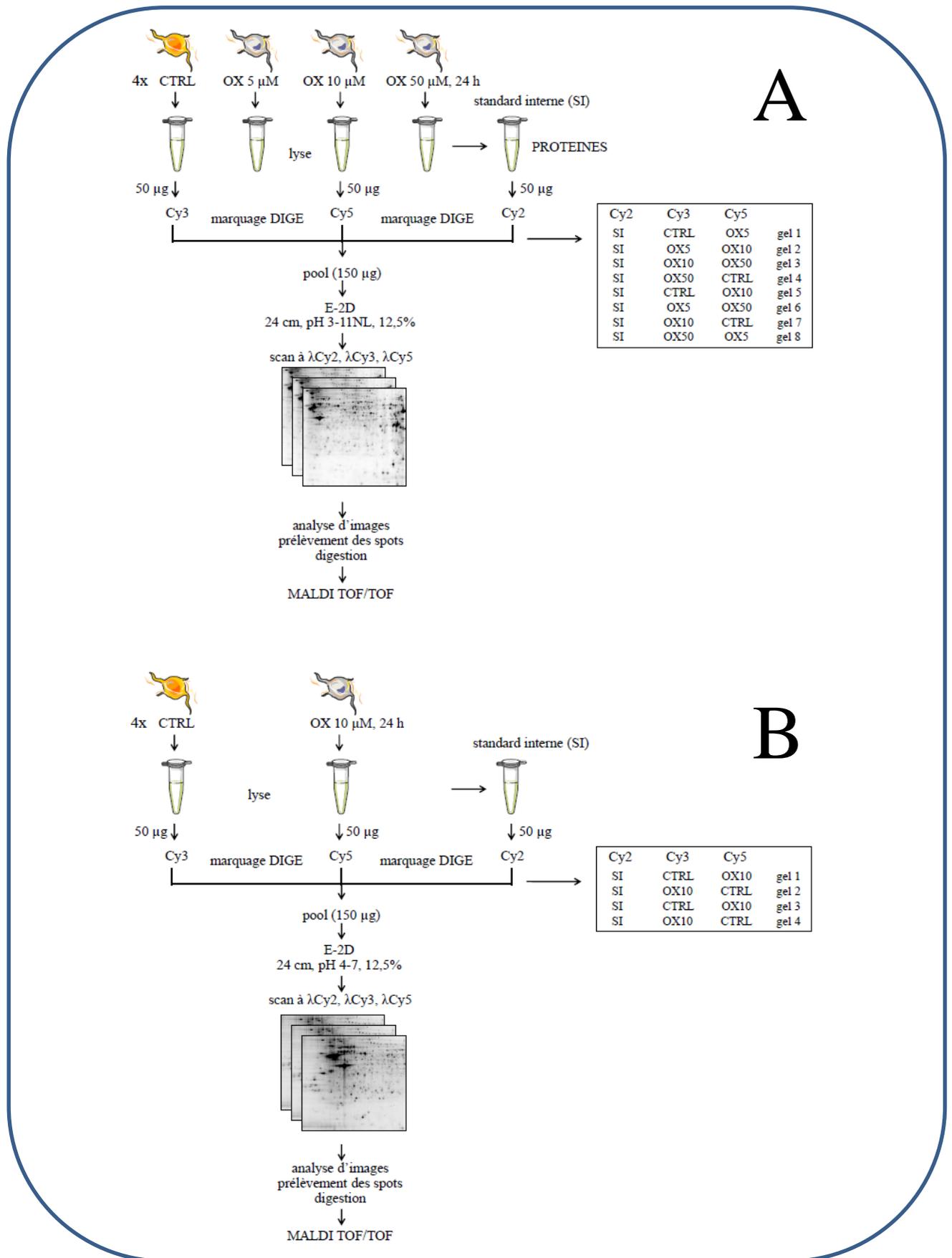
**Figure R-6:** Abondance relative en fonction du nombre de spectres MS/MS des 20 protéines les plus représentées identifiées dans le plasma après immunodéplétion des protéines abondantes (IM) ou traitement par ProteoMiner (PM).

**Tableau R-II:** Quelques-unes des protéines les plus faiblement représentées identifiées avec au moins 2 peptides dans le plasma après immunodéplétion des protéines abondantes (IM) ou traitement par ProteoMiner (PM). Les concentrations associées ont été repérées dans la littérature allant de 5 à 50 000 ng/mL de plasma ou sérum.

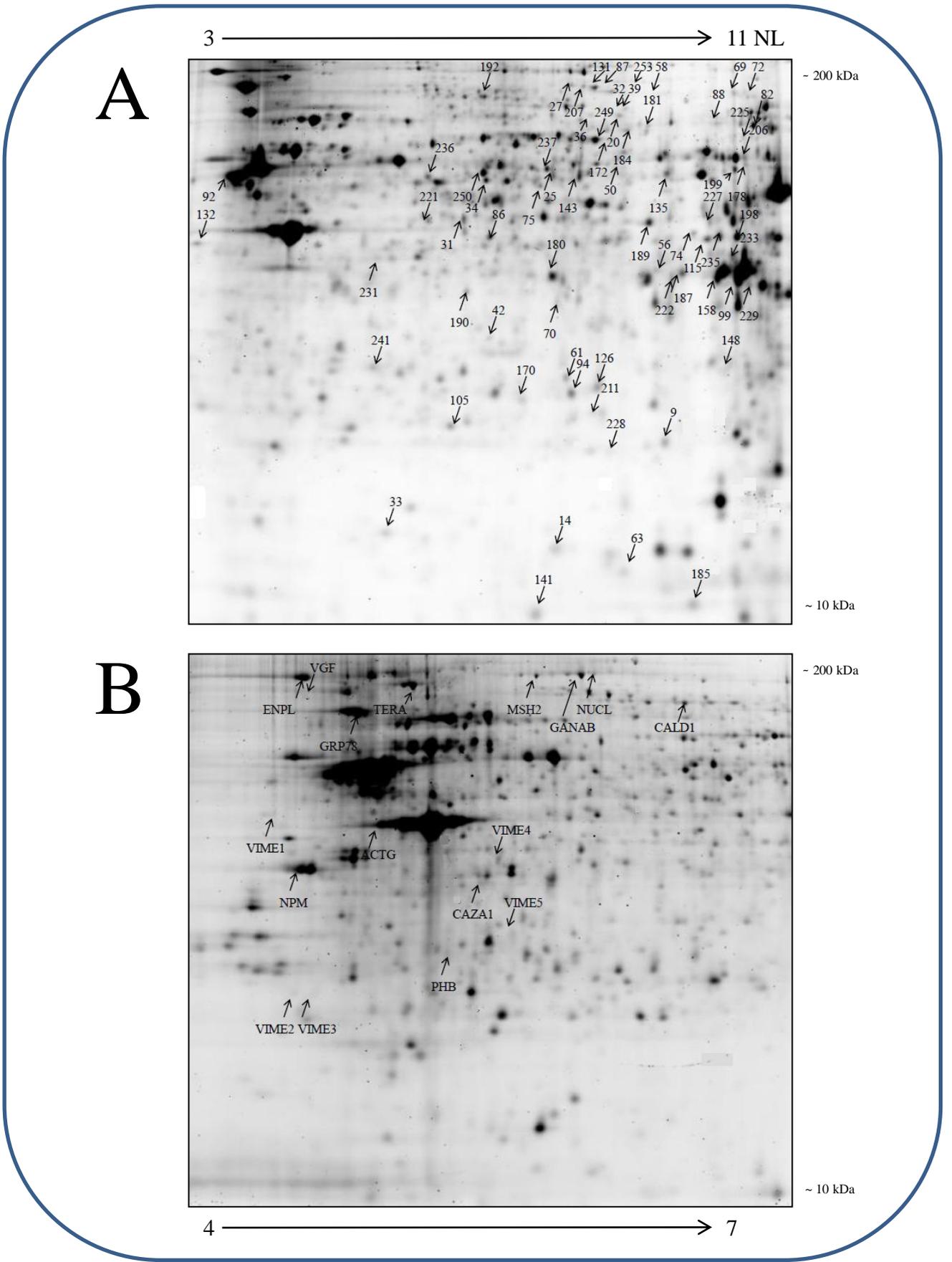
Protein name	Prefractionation	Concentration	Bibliographic reference
Plasma retinol-binding protein	PM	44.4 µg/mL (plasma)	[20]
	IM		
Kallistatin	IM	22.1 µg/mL (plasma)	[21]
Ficolin-3	IM	21.6 µg/mL (plasma)	[22]
Tetranectin	IM	13.75 µg/mL (serum)	[23]
Selenoprotein P	IM	5.3 µg/mL (plasma)	[24]
Von Willebrand factor	PM	1.3 µg/mL (plasma)	[16]
	IM		
Intelectin-1	PM	0.1 to 1.0 µg/mL (serum)	[25]
Extracellular SOD	PM	150 ng/mL (plasma)	[26]
	IM		
Mannose-binding lectin (Protein C)	IM	97 ng/mL (plasma)	[16]
Insulin-like growth factor binding protein 3	PM	59 ng/mL (plasma)	[16]
	IM		
P-selectin	IM	30 ng/mL (plasma)	[17]
Cadherin 5	PM	30 ng/mL (plasma)	[16]
	IM		
Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor (M-CSF R)	IM	26 ng/mL (plasma)	[16]
Hepatocyte growth factor activator	PM	17.6 ng/mL (serum)	[18]
	IM		
Insulin-like growth factor binding protein 2	PM	15 ng/mL (plasma)	[16]
	IM		
Sex hormone-binding globulin	PM	to 8.1 ng/mL (plasma)	[19]
	IM		



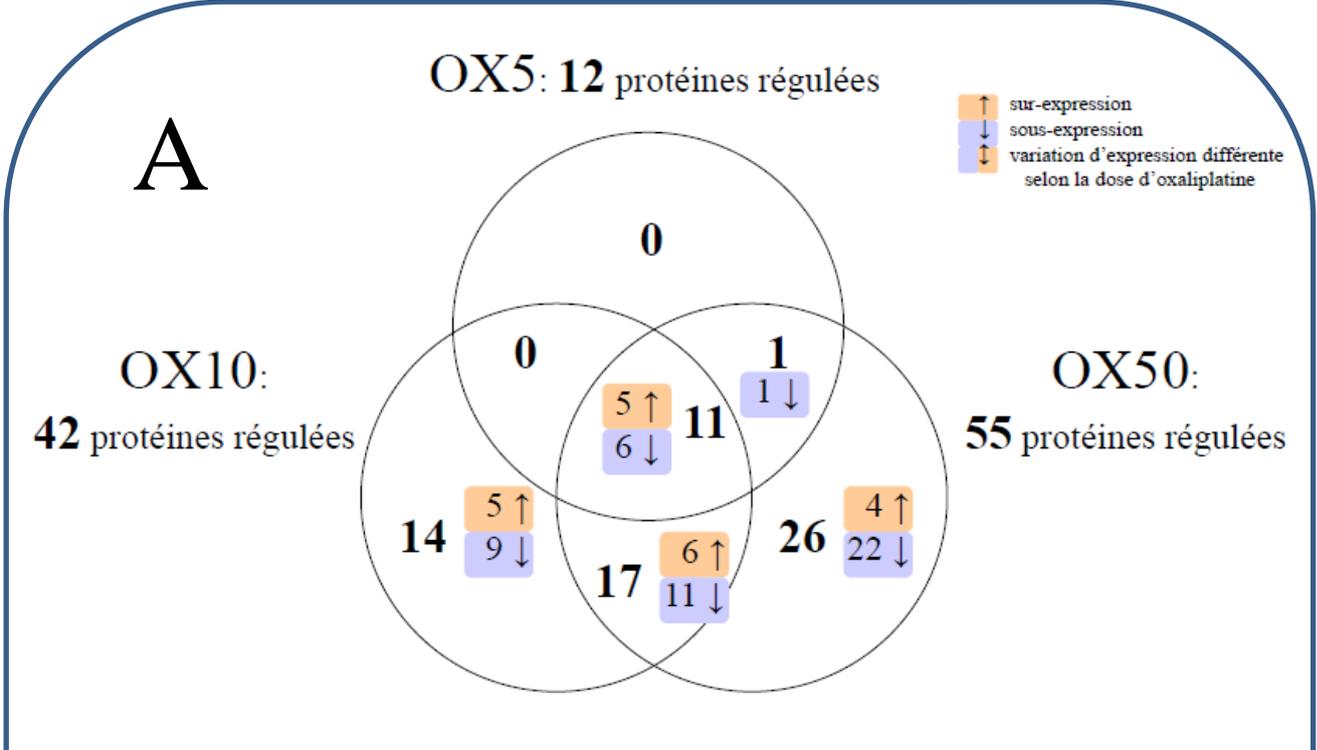
**Figure R-7:** Effet de l'oxaliplatine sur la viabilité des cellules SH-SY5Y évaluée par la méthode MTT 24h après l'addition du médicament dans le milieu de culture. Les données représentent la moyenne des résultats de 3 expériences indépendantes.



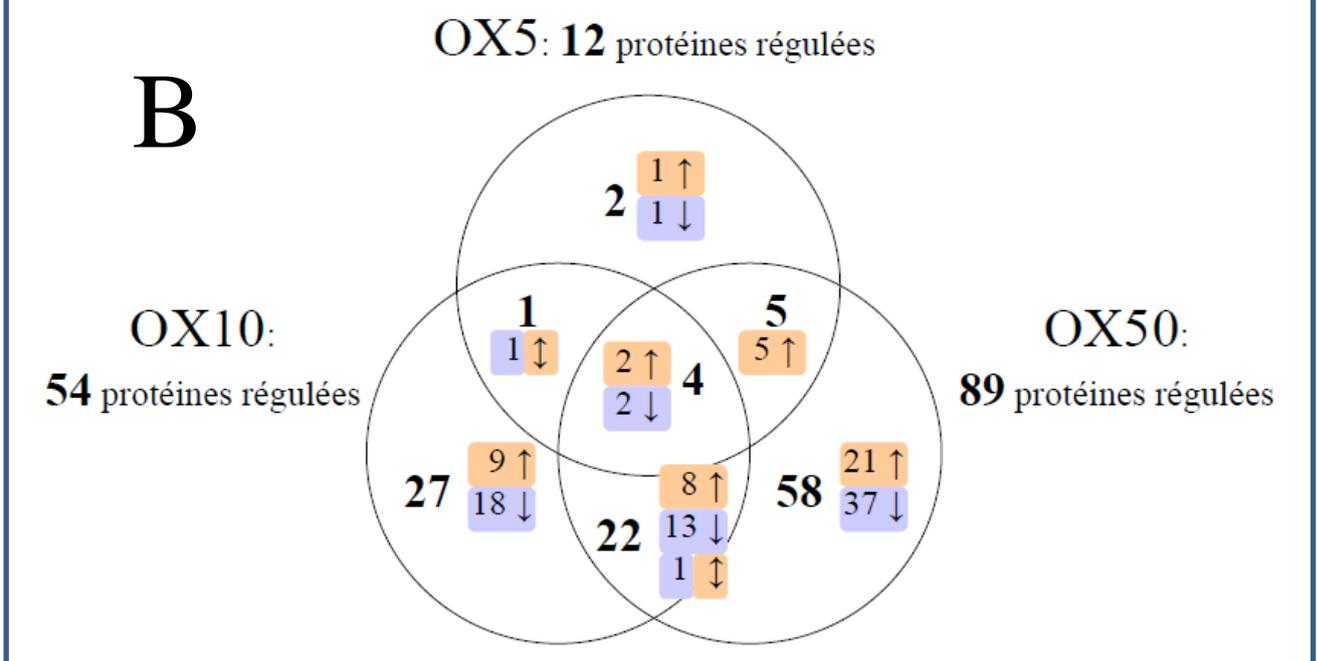
**Figure R-8:** Procédure expérimentale suivie pour analyser l'effet de l'oxaliplatine (24h) sur le protéome intracellulaire (extraits totaux) de 4 répliquats de cellules SH-SY5Y par DIGE-2D entre pH 3-11 – séparation non linéaire (A) et pH 4-7 (B).



**Figure R-9:** Images caractéristiques des cartes du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y obtenues par DIGE-2D entre pH 3-11 – séparation non linéaire (A) et pH 4-7 (B) indiquant la position des protéines régulées par l’oxaliplatine (24h) identifiées par MALDI TOF/TOF. Ces protéines sont répertoriées annexes 2 et 3.

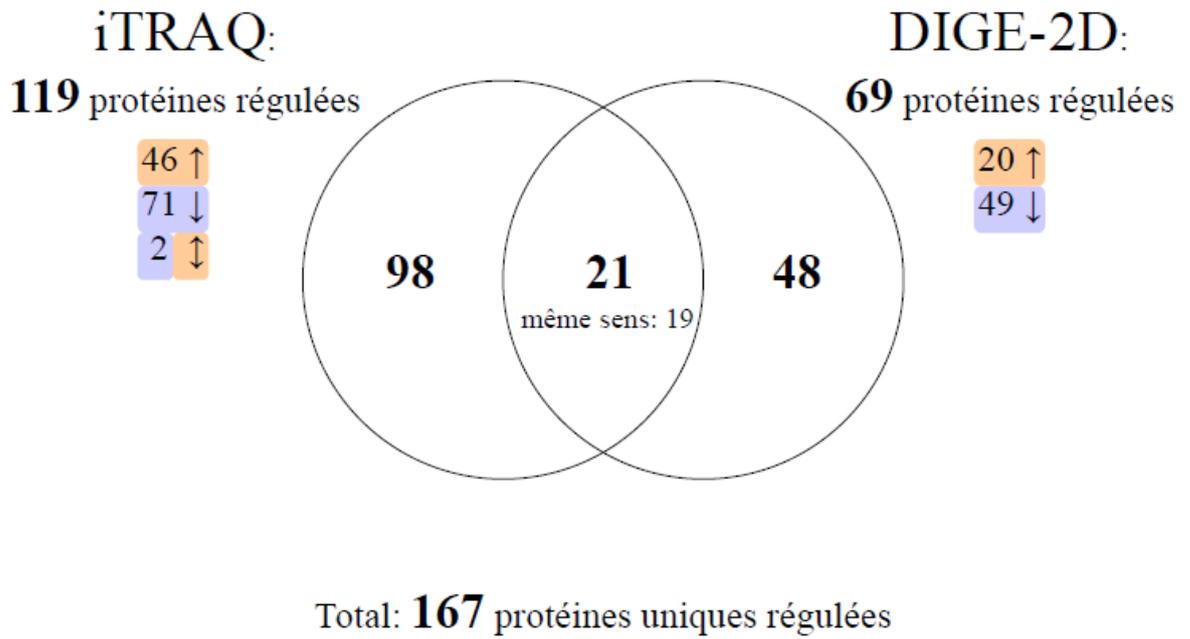


Total: **69** protéines régulées selon l'approche DIGE-2D

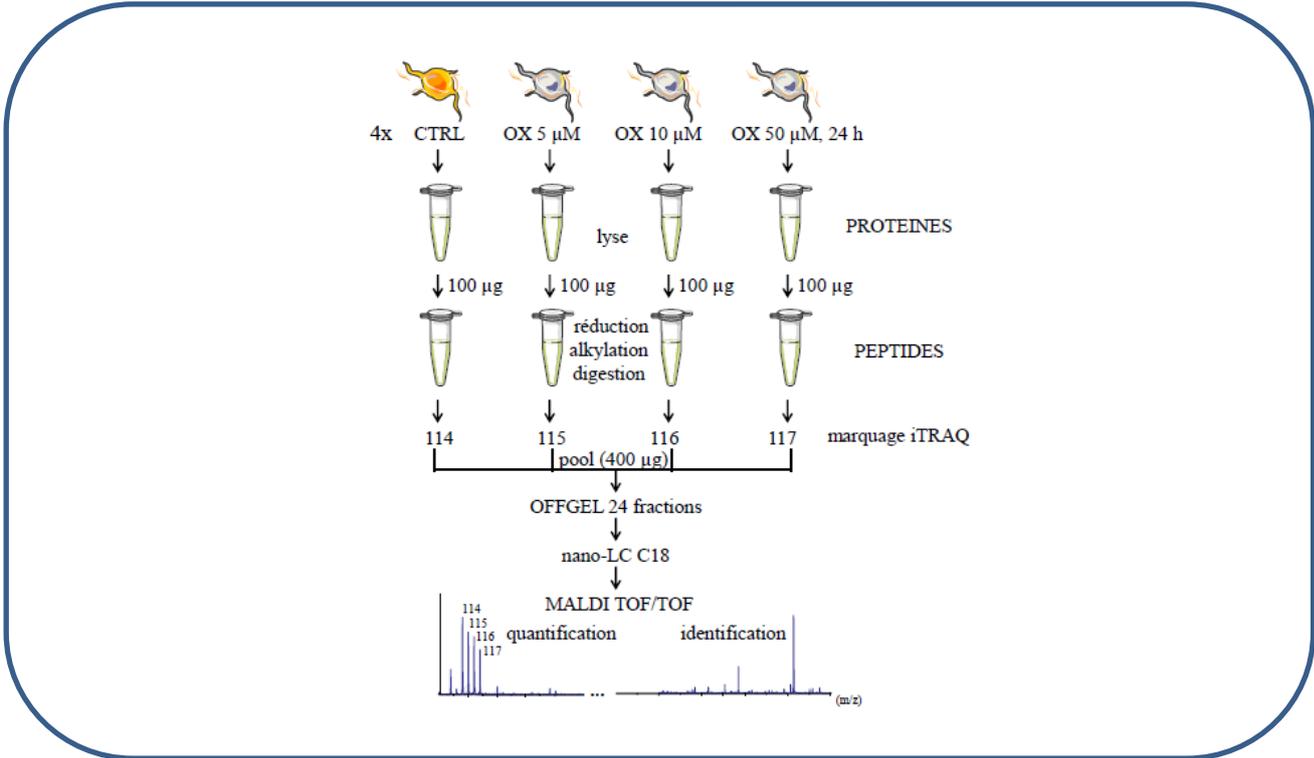


Total: **119** protéines régulées selon l'approche iTRAQ

# C

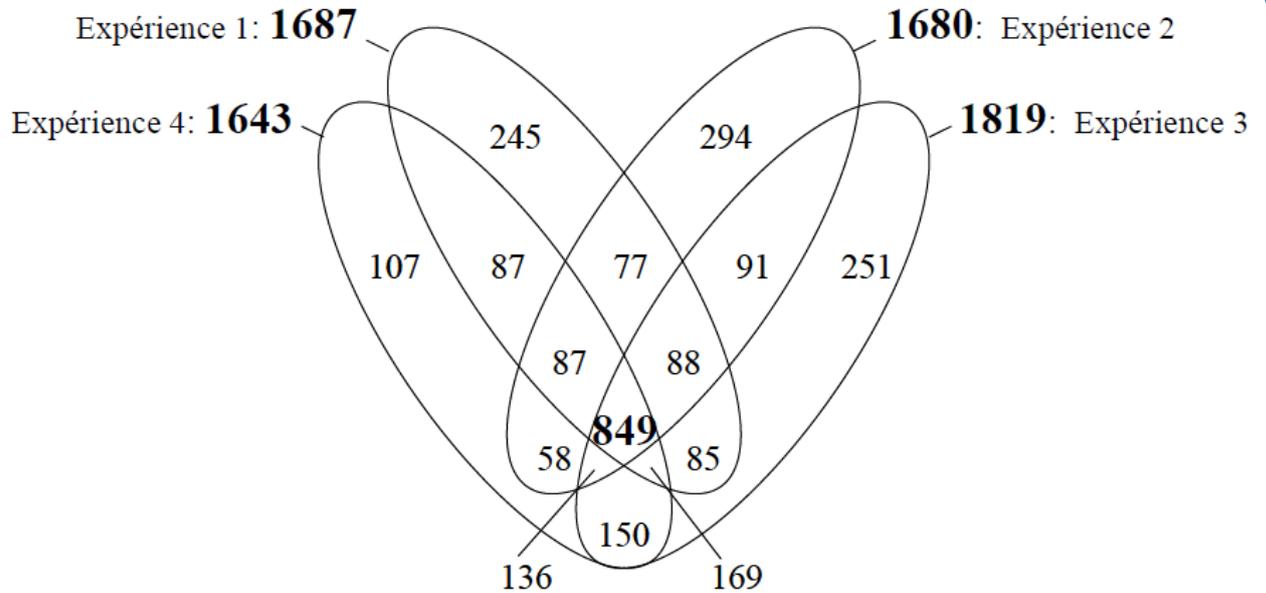


**Figure R-10:** Diagrammes de Venn présentant la répartition des protéines régulées par l'oxaliplatine (24h) identifiées au sein du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y par DIGE-2D (A) ou approche iTRAQ (B) en fonction de la concentration du médicament dans le milieu de culture ou en fonction de la méthode de protéomique quantitative employée (C).

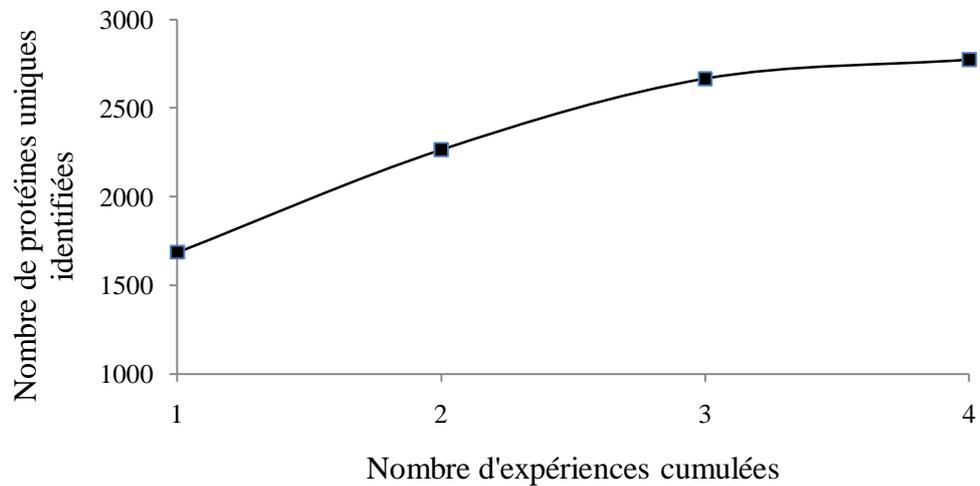


**Figure R-11:** Procédure expérimentale associant marquage iTRAQ / fractionnement OFFGEL / RPLC-MS/MS, suivie pour analyser l'effet de l'oxaliplatine (24h) sur le protéome intracellulaire (extraits totaux) de 4 réplicats de cellules SH-SY5Y.

# A



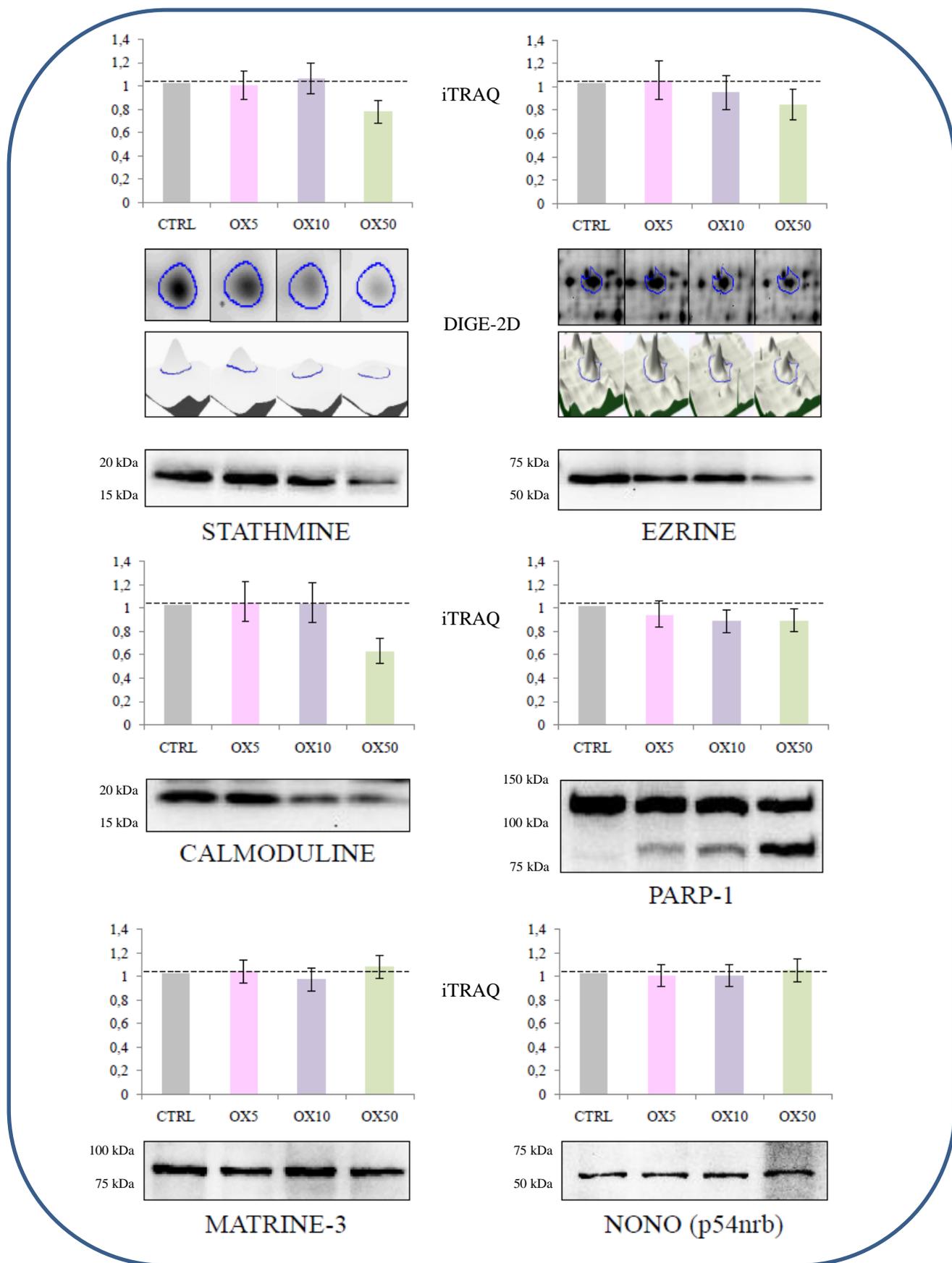
# B



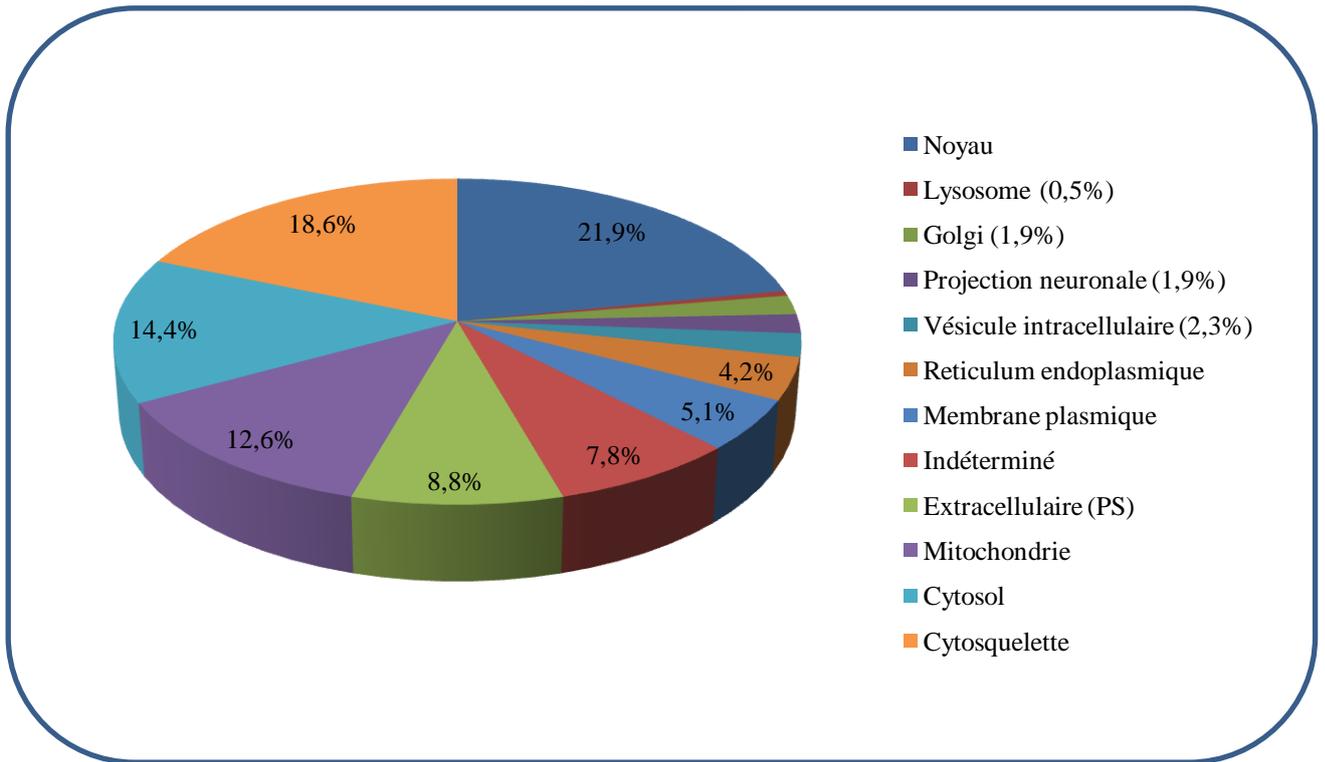
**Figure R-12:** Intérêt des réplicats biologiques pour augmenter le nombre total de protéines identifiées avec au moins 2 peptides au sein des cellules SH-SY5Y par approche iTRAQ.

**A:** Diagramme de Venn présentant la répartition des protéines en fonction de chacune des 4 expériences indépendantes correspondant à 4 réplicats biologiques différents.

**B:** Cumulation des protéines non redondantes identifiées au fur et à mesure des 4 expériences iTRAQ indépendantes. Un plateau est atteint après 4 analyses.

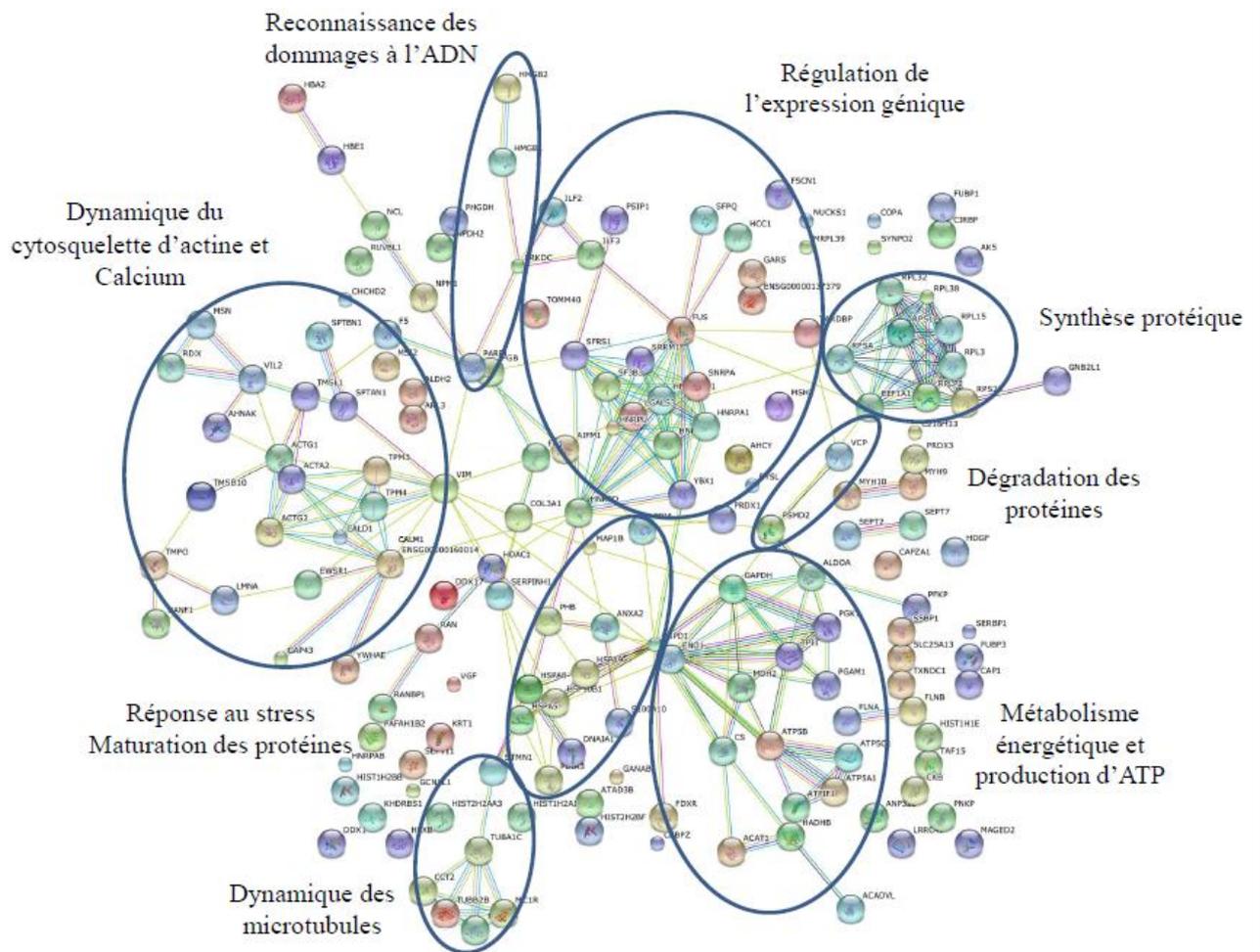


**Figure R-13:** Validation par western-blot (n=3), à l'aide des anticorps indiqués, de la variation d'expression ( $\Delta E$ ) de quelques protéines choisies arbitrairement, déterminée par approche iTRAQ et/ou DIGE-2D au sein des cellules SH-SY5Y après traitement par les différentes doses d'oxaliplatine pendant 24h. Sont aussi présentés les vues 2D et 3D de spots DIGE-2D ainsi que les histogrammes de quantification relative iTRAQ par rapport au CTRL ( $\Delta E=1$ ) réalisés à partir des données du logiciel iQuantitator.



**Figure R-14:** Distribution en fonction de leur localisation subcellulaire des 167 protéines régulées par l'oxaliplatine (24h, 3 doses OX5, OX10 et OX50 combinées), identifiées au sein du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y par approche iTRAQ/DIGE-2D. La localisation de chaque protéine a été obtenue à partir de la base d'annotations GO\_ cellular component en utilisant le logiciel DAVID. PS: peptide signal

## PROTEINES REGULEES: TOTAL

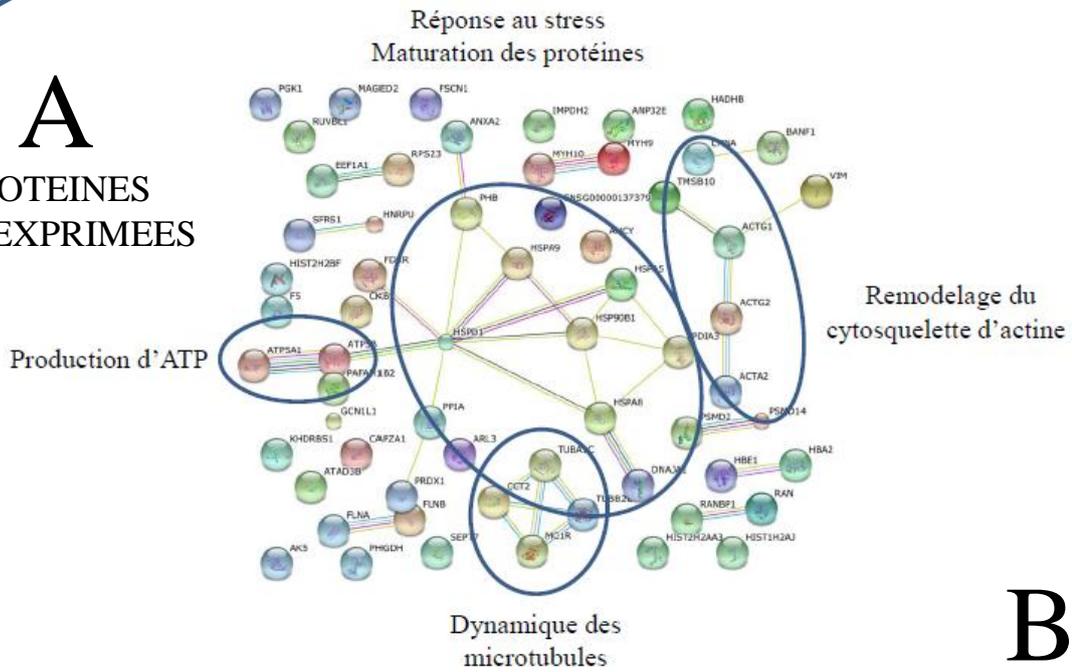


**Figure R-15:** Réseau d'interactions protéine-protéine et groupes protéiques fonctionnels formés à l'aide de la base de données STRING (indice de confiance élevé – 0,700) avec les 167 protéines régulées par l'oxaliplatine (24h, 3 doses OX5, OX10 et OX50 combinées), identifiées au sein du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y par approche iTRAQ/DIGE-2D.

Les connexions interprotéiques reposent sur la synténie (trait vert foncé), la cooccurrence (trait bleu foncé), la coexpression (trait noir), les données de la littérature (trait vert clair), l'expérimentation – coimmunoprécipitation ou double-hybride (trait violet), les gènes de fusion (trait rouge) ou les bases de données (trait bleu clair).

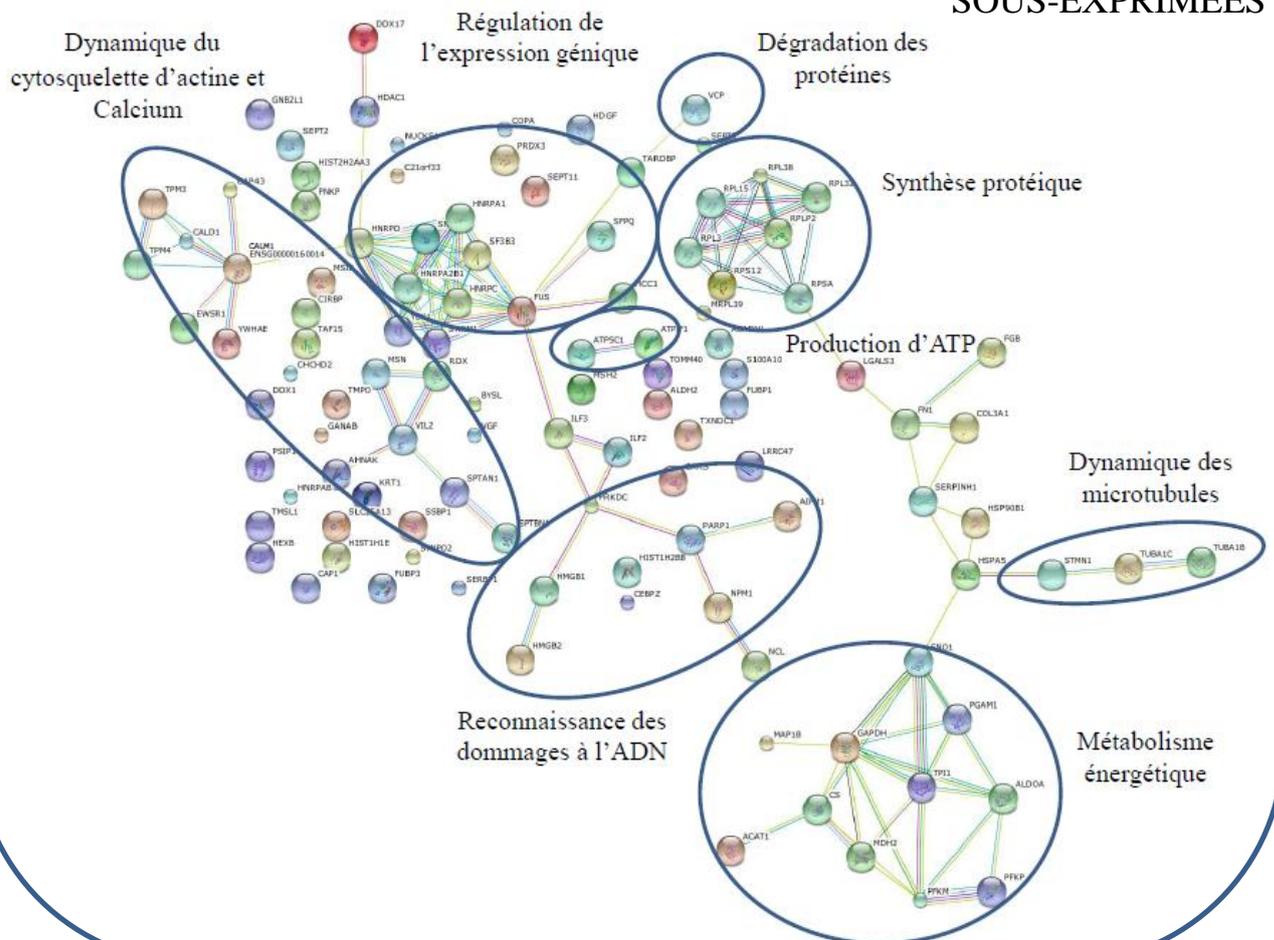
# A

## PROTEINES SUR-EXPRIMEES



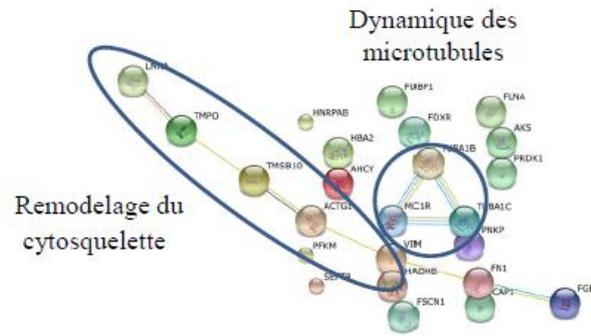
# B

## PROTEINES SOUS-EXPRIMEES

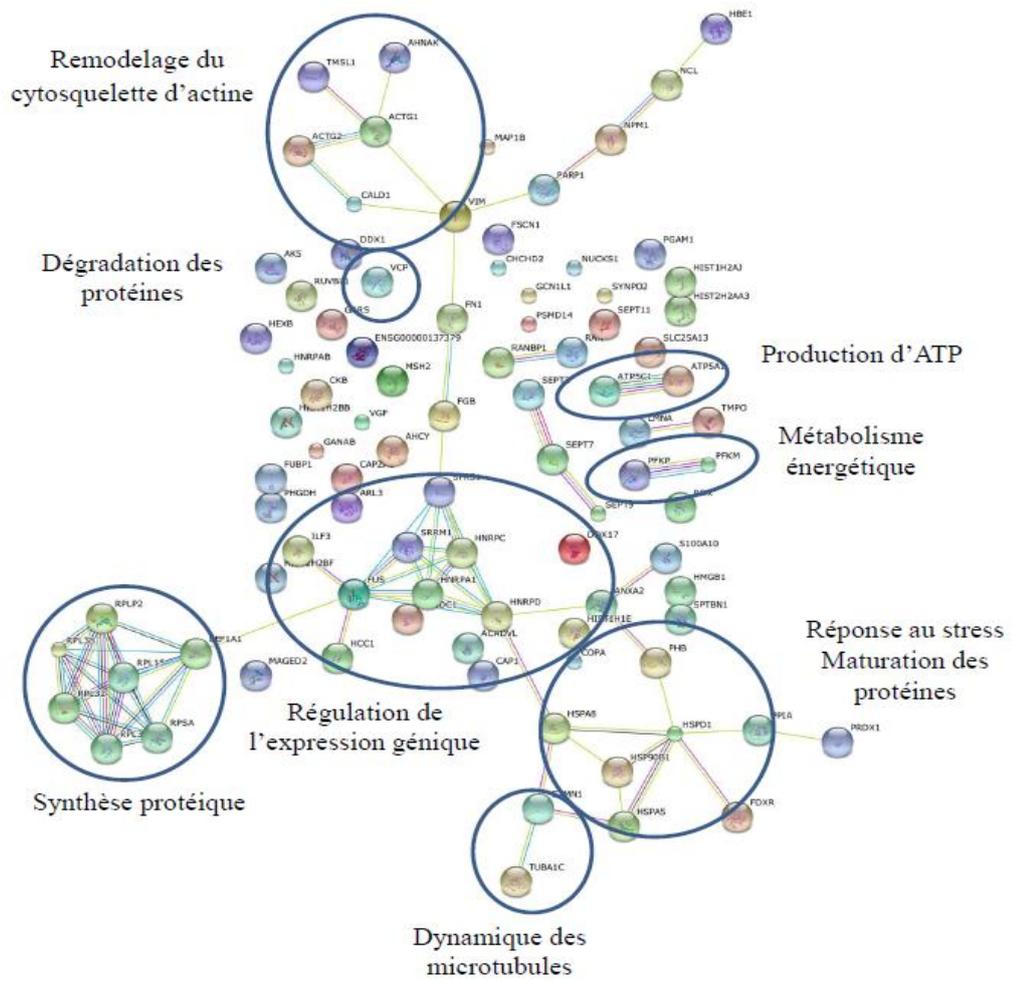


**Figure R-16:** Réseau d'interactions protéine-protéine et groupes protéiques fonctionnels formés à l'aide de la base de données STRING (indice de confiance élevé – 0,700) avec les protéines sur-exprimées (A) et sous-exprimées (B) par l'oxaliplatine (24h, 3 doses OX5, OX10 et OX50 combinées), identifiées au sein du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y par approche iTRAQ/DIGE-2D. Les connexions interprotéiques reposent sur la synténie (trait vert foncé), la cooccurrence (trait bleu foncé), la coexpression (trait noir), les données de la littérature (trait vert clair), l'expérimentation – coimmunoprécipitation ou double-hybride (trait violet), les gènes de fusion (trait rouge) ou les bases de données (trait bleu clair).

**A**  
OX5

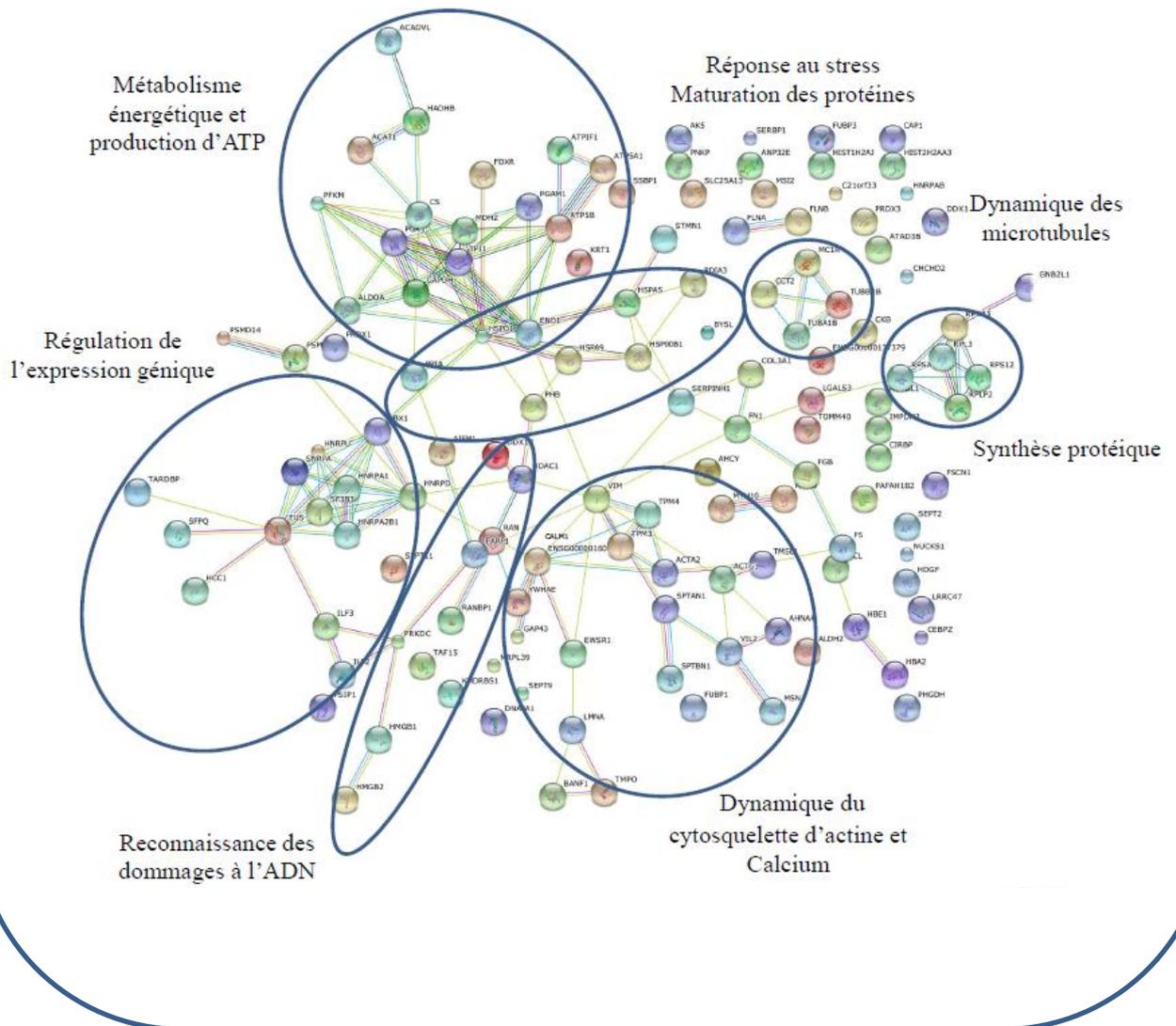


**B**  
OX10



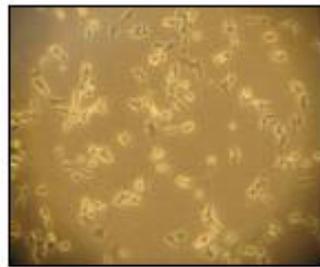
# C

## OX50

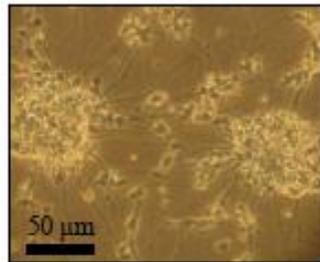


**Figure R-17:** Réseau d'interactions protéine-protéine et groupes protéiques fonctionnels formés à l'aide de la base de données STRING (indice de confiance élevé – 0,700) avec les protéines régulées par OX5 (A), OX10 (B) et OX50 (C) pendant 24h, identifiées au sein du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y par approche iTRAQ/DIGE-2D.

Les connexions interprotéiques reposent sur la synténie (trait vert foncé), la cooccurrence (trait bleu foncé), la coexpression (trait noir), les données de la littérature (trait vert clair), l'expérimentation – coimmunoprécipitation ou double-hybride (trait violet), les gènes de fusion (trait rouge) ou les bases de données (trait bleu clair).



Cellules SH-SY5Y naïves  
15% SVF

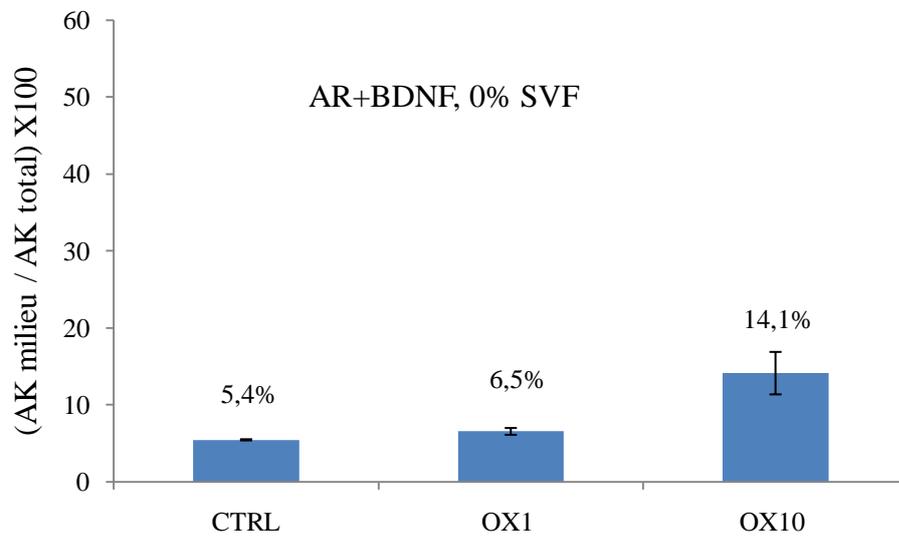


Cellules SH-SY5Y différenciées  
5j AR, 15% SVF puis 10j BDNF, 0% SVF

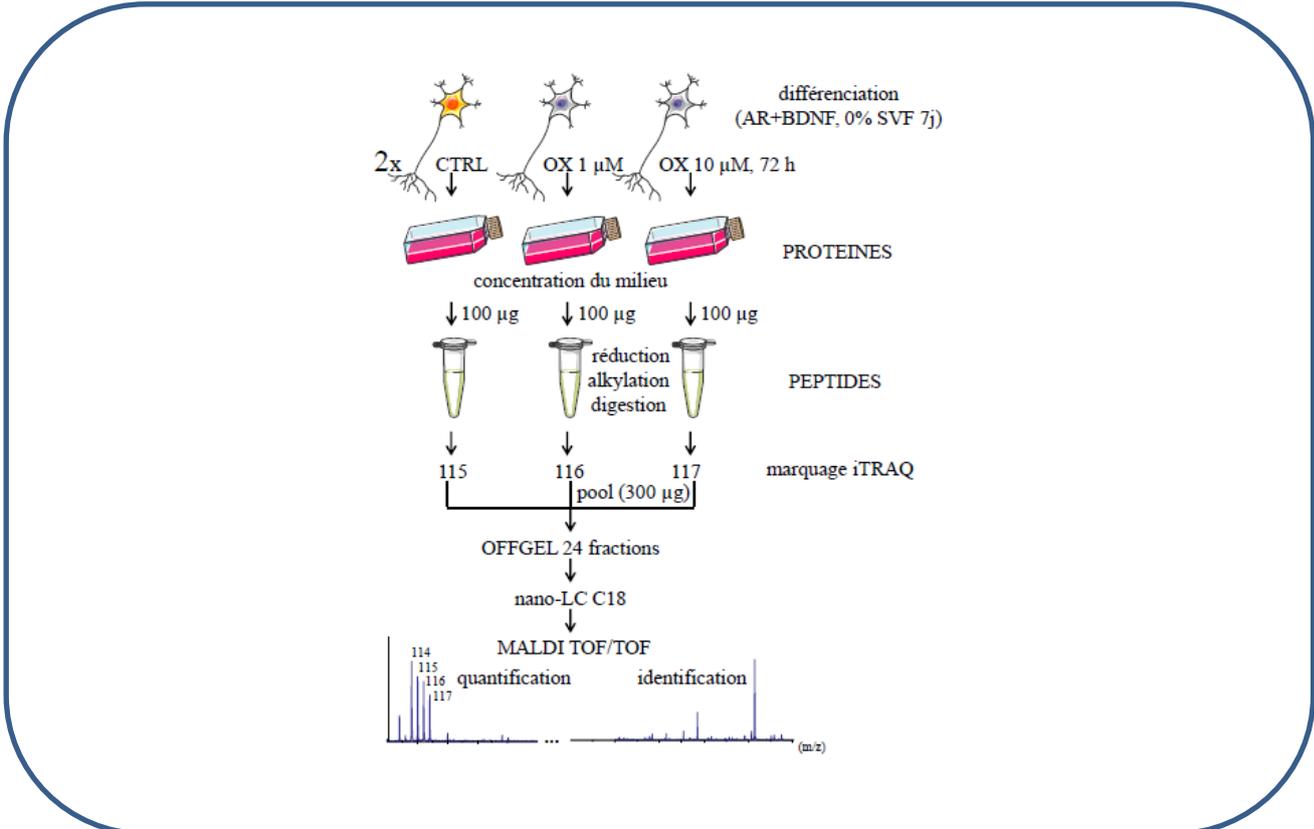
**Figure R-18:** Induction de la différenciation des cellules SH-SY5Y par un traitement séquentiel avec acide rétinoïque et BDNF.

Les cellules sont d'abord cultivées en milieu complet (15% sérum) contenant 10  $\mu\text{M}$  d'acide rétinoïque pendant 5j puis en milieu sans sérum contenant 50 ng/ml de BDNF pendant 7j. Elles sont alors traitées à l'oxaliplatine avec 50 ng/ml de BDNF toujours en absence de sérum pendant 3j.

Les cellules CTRL sont quant à elles cultivées en milieu complet (15% sérum) contenant 10  $\mu\text{M}$  d'acide rétinoïque pendant 5j puis en milieu sans sérum contenant 50 ng/ml de BDNF pendant 10j. Les cellules différenciées adoptent une morphologie neuronale, avec une abondante arborisation neuritique.

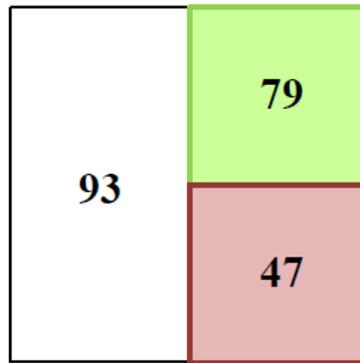


**Figure R-19:** Evaluation du taux de protéines intracellulaires contaminant le sécrétome des cellules SH-SY5Y différenciées par l'acide rétinoïque puis le BDNF en absence de sérum, après 72h de traitement à l'oxaliplatine. La cytotoxicité du médicament est évaluée par le dosage de la protéine intracellulaire adénylate kinase (AK) dans le milieu à l'aide du kit ToxiLight (Lonza). L'AK totale est dosée après la lyse des cellules dans le milieu.  
Les données représentent la moyenne des résultats de 3 expériences indépendantes.



**Figure R-20:** Procédure expérimentale associant marquage iTRAQ / fractionnement OFFGEL / RPLC-MS/MS, suivie pour analyser l'effet de l'oxaliplatine (72h) sur le sécrétome de 2 réplicats de cellules SH-SY5Y différenciées par 10 μM d'acide rétinoïque pendant 5j puis 50 ng/ml de BDNF en absence de sérum pendant 7j.

**A**



PS: peptide signal  
 VNC: voie non classique  
 NS: non sécrétée

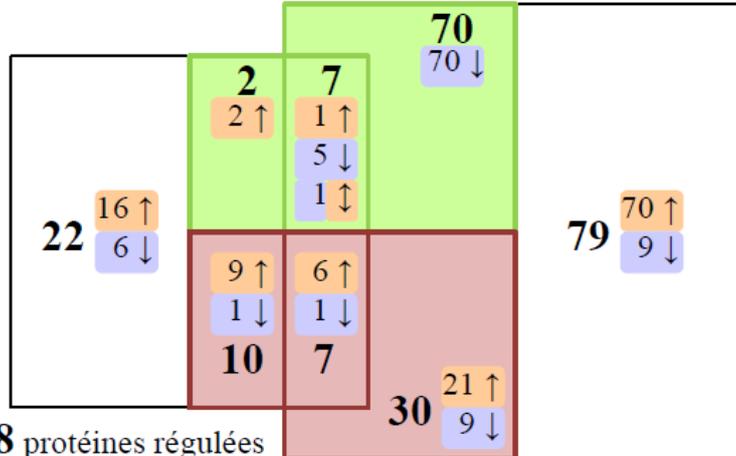
+ 1 : non déterminé\*

Total: **220** protéines régulées

**B**

↑ sur-expression  
 ↓ sous-expression  
 ↕ variation d'expression différente  
 selon la dose d'oxaliplatine

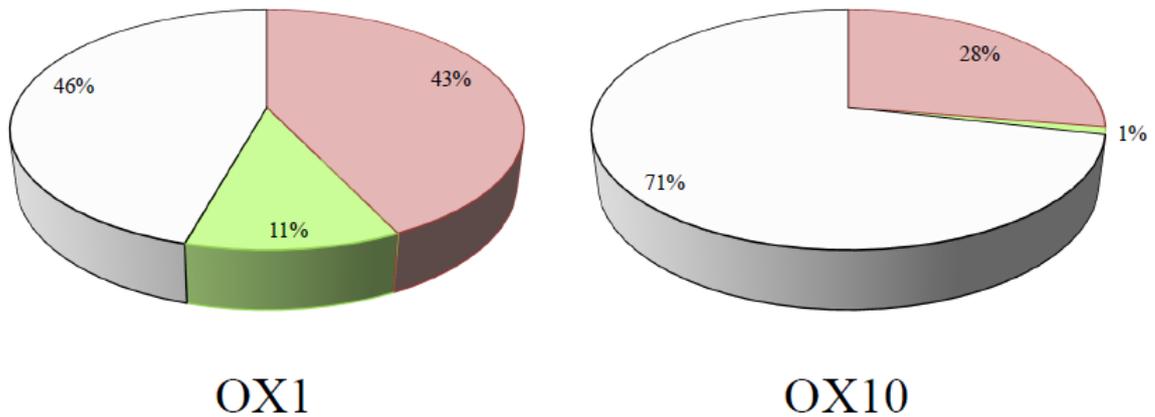
OX10: **194** protéines régulées  
 (dont 1 : non déterminé)\*



OX1: **48** protéines régulées

Total: **220** protéines régulées

# C



**Figure R-21:** Diagrammes présentant la répartition des 220 protéines régulées par l'oxaliplatine (72h) identifiées au sein du sécrétome des cellules SH-SY5Y par approche iTRAQ, selon que les protéines portent un peptide signal, sont sécrétées par la voie non classique indépendante du RE/Golgi ou ne sont pas sécrétées.

**A:** Analyse globale: les protéines régulées par OX1 et OX10 sont confondues.

**B:** Répartition des protéines en fonction de la concentration du médicament dans le milieu de culture et selon que les protéines sont sur- ou sous-exprimées.

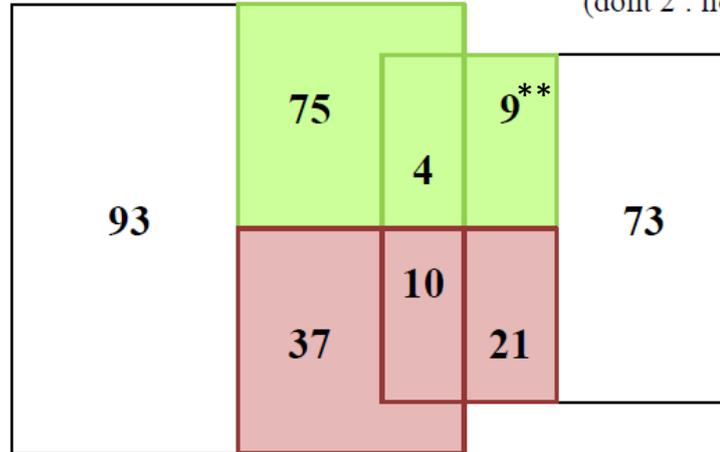
**C:** Distribution en pourcentage des protéines sur-exprimées en fonction de la concentration en oxaliplatine.

\* non déterminé: les protéines de séquence trop longue ne peuvent être analysées par les logiciels de prédiction de sécrétion.

PS: peptide signal  
 VNC: voie non classique  
 NS: non sécrétée

### Protéome intracellulaire :

**119** protéines régulées (iTRAQ)  
(dont 2 : non déterminé)\*



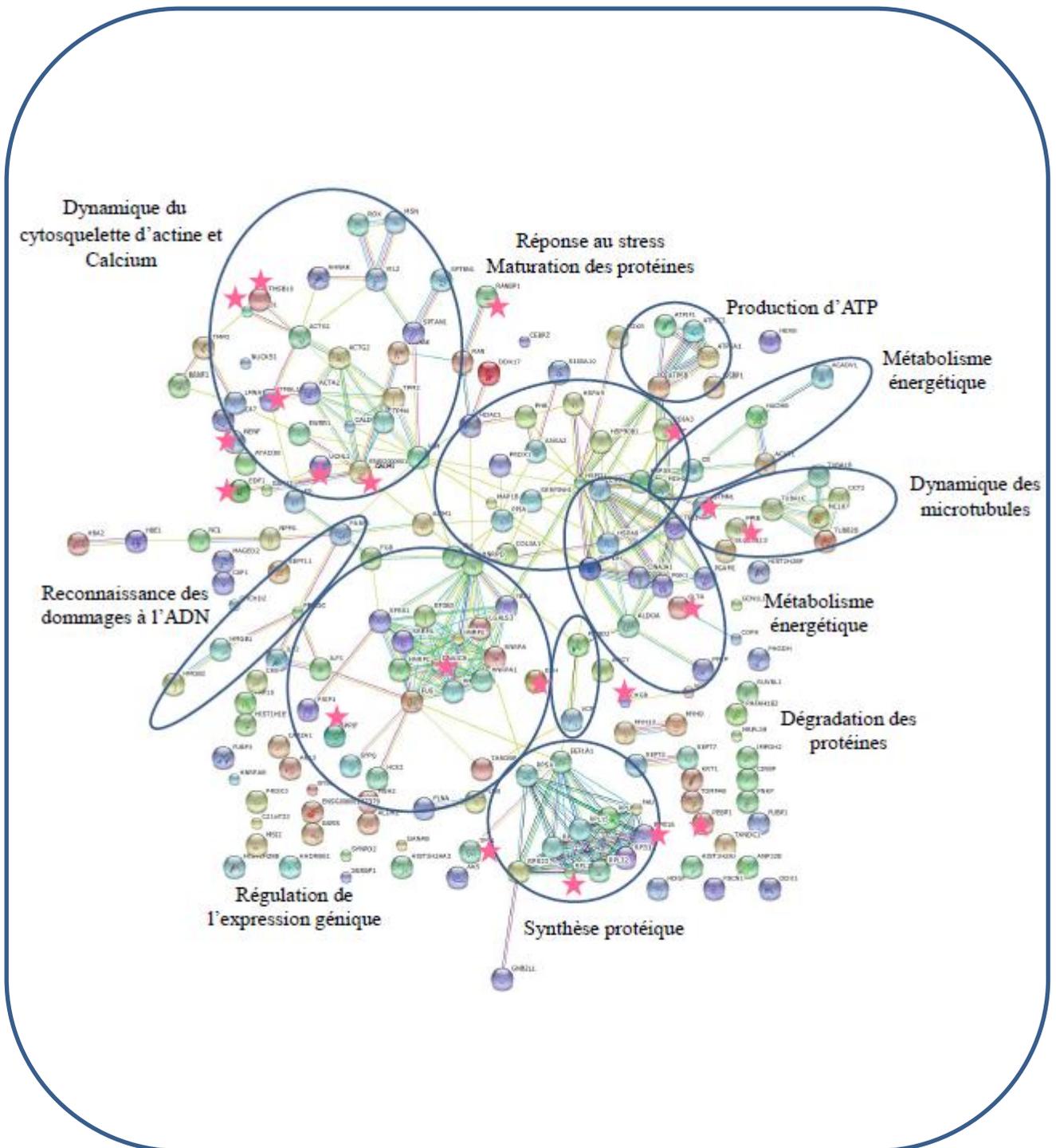
### Sécrétome :

**220** protéines régulées (iTRAQ)  
(dont 1 : non déterminé)\*

\*\* : 2 protéines possèdent la séquence KDEL

**Figure R-22:** Diagramme présentant la répartition des protéines régulées par l'oxaliplatine identifiées au sein du protéome intracellulaire et du sécrétome des cellules SH-SY5Y par approche iTRAQ, selon que les protéines portent un peptide signal, sont sécrétées par la voie non classique indépendante du RE/Golgi ou ne sont pas sécrétées.

\* non déterminé: les protéines de séquence trop longue ne peuvent être analysées par les logiciels de prédiction de sécrétion.

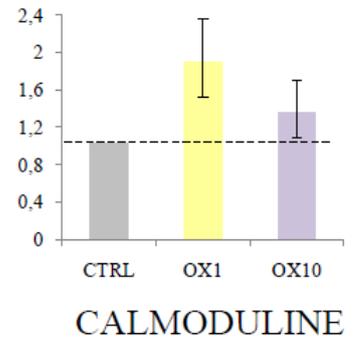
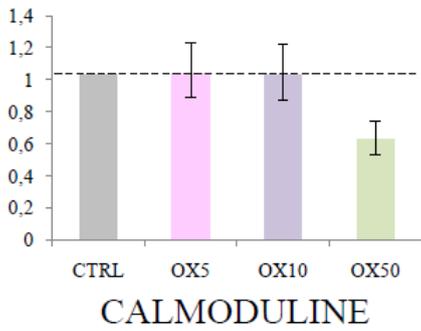
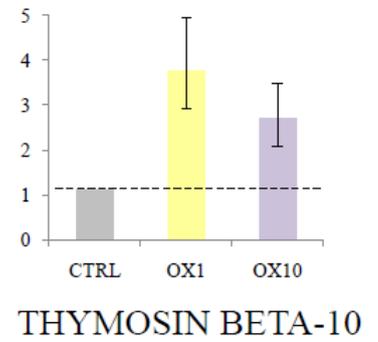
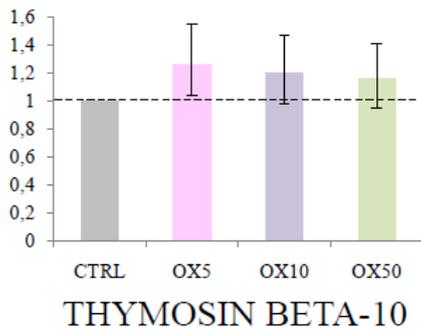


**Figure R-23:** Interaction des 19 protéines prédites sécrétées (étoiles roses), sur-exprimées par OX1 (72h) dans le sécrétome des cellules SH-SY5Y, identifiées par approche iTRAQ (avec au moins 2 peptides), avec le réseau des groupes protéiques fonctionnels formés à l'aide de la base de données STRING (indice de confiance élevé – 0,700) par les 167 protéines régulées par l'oxaliplatine (24h, 3 doses OX5, OX10 et OX50 combinées), identifiées au sein du protéome intracellulaire des cellules SH-SY5Y par approche iTRAQ/DIGE-2D.

[La neudésine est aussi représentée.]

Les connexions interprotéiques reposent sur la synténie (trait vert foncé), la cooccurrence (trait bleu foncé), la coexpression (trait noir), les données de la littérature (trait vert clair), l'expérimentation – coimmunoprécipitation ou double-hybride (trait violet), les gènes de fusion (trait rouge) ou les bases de données (trait bleu clair).

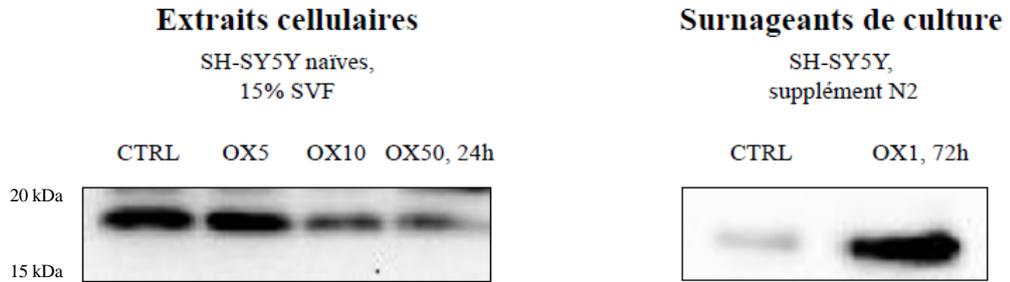
# A



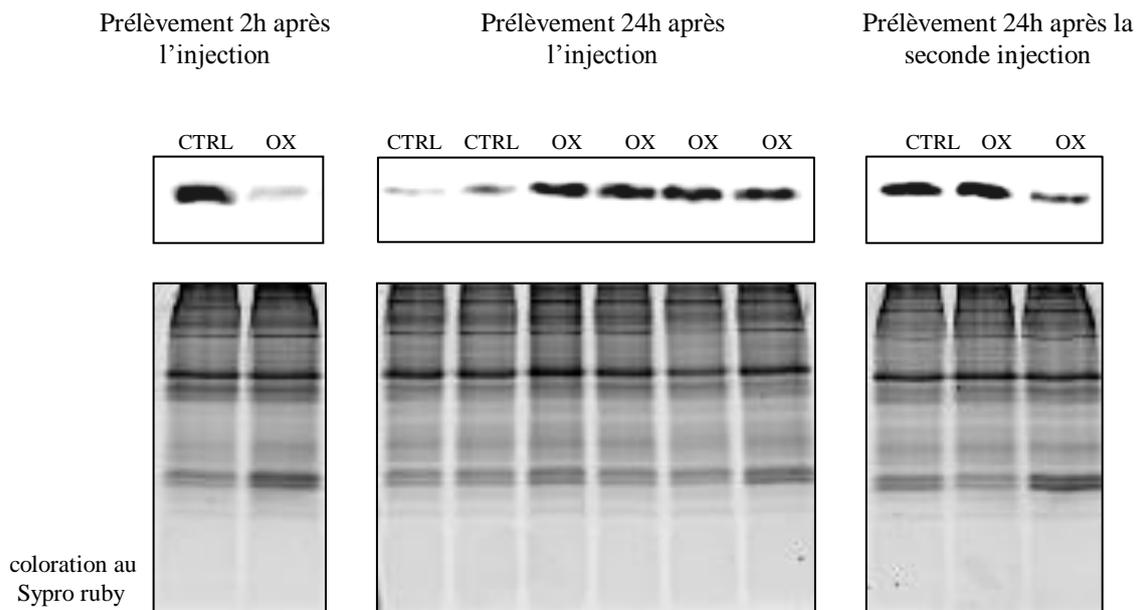
**Protéome intracellulaire**

**Sécrétome**

# B



# C



**Figure R-24:** Evaluation de candidats biomarqueurs de la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

**A:** Histogrammes de quantification relative iTRAQ par rapport au CTRL de la thymosine beta-10 et de la calmoduline dans le protéome intracellulaire et le sécrétome des cellules SH-SY5Y suite au traitement par l'oxaliplatine, réalisés à partir des données du logiciel iQuantitor.

**B:** Western-blots de la calmoduline dans les extraits cellulaires et surnageants de culture des cellules SH-SY5Y après traitement par l'oxaliplatine.

**C:** Western-blots de la calmoduline au sein des DRG de rats traités par oxaliplatine en intraveineuse.

# A

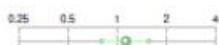
72h

## Sécrétome

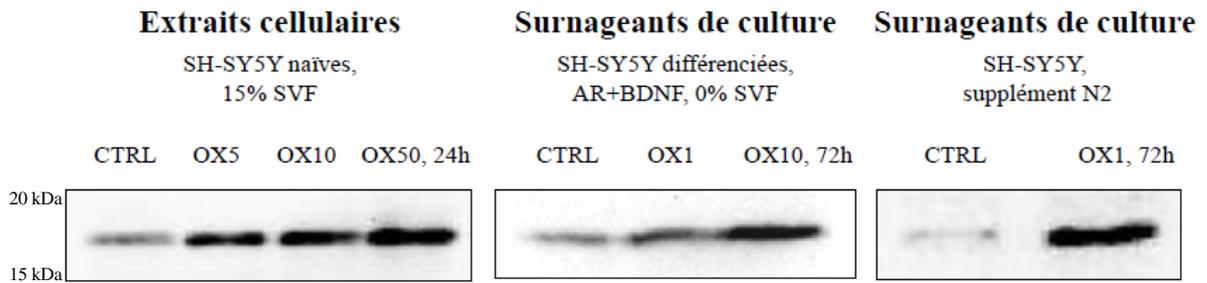
OX1/CTRL	Protein Accession	sp Q9UMX5 NENF_HUMAN	
	Mean Expression Ratio	1.32	
	Median Expression Ratio	1.33	
	Credible Interval	(0.884, 1.99)	
	Associated Peptides	1	A 2.5 50 97.5 Sequence 4 2.1 2.8 3.8 GVVFDTSGKEFYGR
	Associated Spectra	4	
Coverage	NaN		
OX10/CTRL	Mean Expression Ratio	1.22	
	Median Expression Ratio	1.21	
	Credible Interval	(0.825, 1.80)	
	Associated Peptides	1	A 2.5 50 97.5 Sequence 4 1.6 2.1 2.8 GVVFDTSGKEFYGR
	Associated Spectra	4	
	Coverage	NaN	

24h

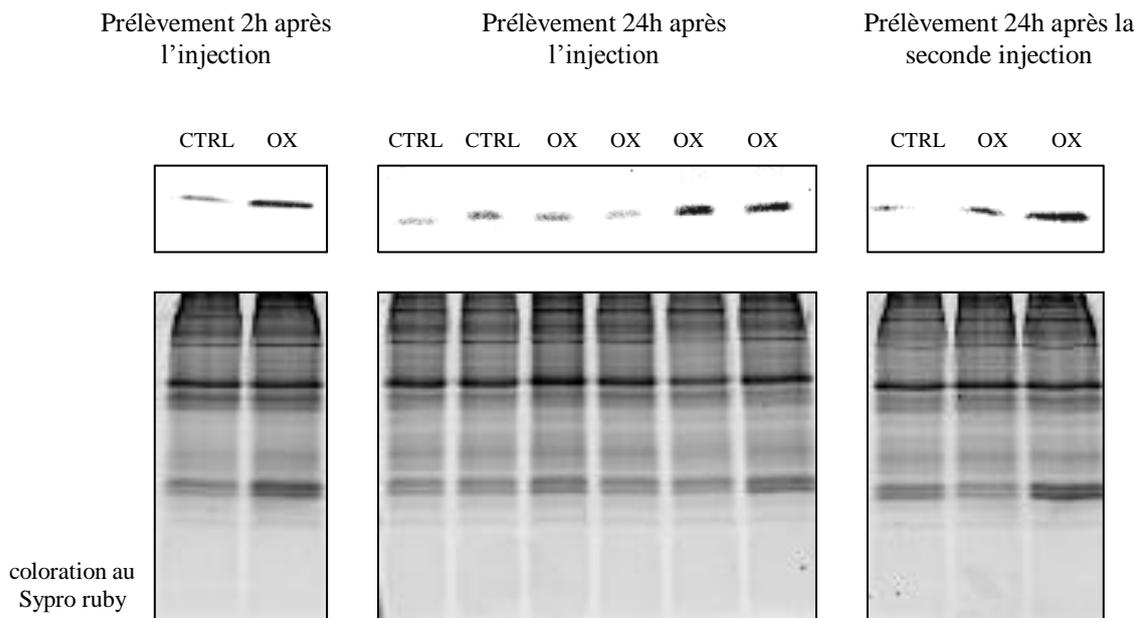
## Protéome intracellulaire

OX5/CTRL	Protein Accession	Q9UMX5 NENF_HUMAN	
	Mean Expression Ratio	1.03	
	Median Expression Ratio	1.03	
	Credible Interval	(0.834, 1.28)	
	Associated Peptides	2	A 2.5 50 97.5 Sequence 2 0.77 1.1 1.5 YDFICYTAR 3 0.6 1.1 1.5 GVVFDTSGKEFYGR
	Associated Spectra	5	
Coverage	NaN		
OX10/CTRL	Mean Expression Ratio	0.995	
	Median Expression Ratio	0.995	
	Credible Interval	(0.809, 1.23)	
	Associated Peptides	2	A 2.5 50 97.5 Sequence 2 0.81 1.1 1.6 YDFICYTAR 3 0.64 0.86 1.2 GVVFDTSGKEFYGR
	Associated Spectra	5	
	Coverage	NaN	
OX50/CTRL	Mean Expression Ratio	1.06	
	Median Expression Ratio	1.06	
	Credible Interval	(0.855, 1.31)	
	Associated Peptides	2	A 2.5 50 97.5 Sequence 2 0.59 0.82 1.2 YDFICYTAR 3 1.2 1.6 2.2 GVVFDTSGKEFYGR
	Associated Spectra	5	
	Coverage	NaN	

# B



# C



**Figure R-25:** La neudésine, candidat biomarqueur de la neurotoxicité de l'oxaliplatine.

**A:** Diagrammes de quantification iTRAQ de la neudésine dans le protéome intracellulaire et le sécrétome des cellules SH-SY5Y suite au traitement par l'oxaliplatine, fournis par le logiciel iQuantitator.

**B:** Western-blots de validation de la sur-expression de la neudésine dans les extraits cellulaires et surnageants de culture des cellules SH-SY5Y après traitement par l'oxaliplatine.

**C:** Western-blots de validation de la sur-expression de la neudésine au sein des DRG de rats traités par oxaliplatine en intraveineuse.

**Tableau R-III:** Protéines identifiées par approche iTRAQ/DIGE-2D comme différentiellement exprimées au sein du protéome intracellulaire suite au traitement par l'oxaliplatine (24h) des cellules SH-SY5Y et répertoriées dans les bases de données des maladies humaines OMIM (A) et GAD - Genetic Association Database (B). Les protéines dont les gènes sont soulignés sont répertoriées dans les 2 bases.

# A

Gène	Protéine	Accession	Maladie	Identifiant OMIM gene	maladie
ACTB	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	P60709	Dystonie	*102630	#607371
<u>ACTG1</u>	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	P63261	Surdité	*102560	#604717
FUS	RNA-binding protein FUS	P35637	Sclérose amyotrophique latérale	*137070	#608030
<u>GARS</u>	Glycyl-tRNA synthetase	P41250	Charcot-Marie-Tooth	*600287	#601472
<u>HEXB</u>	Beta-hexosaminidase subunit beta	P07686	Neuronopathie		#600794
<u>HSPD1</u>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	Sandhoff	*606873	#268800
			Paralysie spastique	*118190	#605280
			Leucodystrophie hypomyélinisante		#612233
<u>LMNA</u>	Lamin-A/C	P02545	Charcot-Marie-Tooth	*150330	#605588
			Dystrophie musculaire		#159001
			Dystrophie musculaire Emery-Dreifuss		#181350
<u>MYH9</u>	Myosin-9	P35579	Surdité	*160775	#603622
RDX	Radixin	P35241	Surdité	*179410	#611022
<u>SEPT9</u>	Septin-9	Q9UHD8	Amyotrophie névralgique	*604061	#162100
<u>TARDBP</u>	TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)	Q13148	Sclérose amyotrophique latérale	*605078	#612069
<u>TPM3</u>	Tropomyosin alpha-3 chain	P06753	Myopathie à némaline	*191030	#609284
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP/p97)	P55072	Myopathie à corps d'inclusion	*601023	#167320
<u>YWHAE</u>	14-3-3 protein epsilon	P62258	Syndrome lissencéphalique de Miller-Dieker	*605066	#247200

# B

Gène	Protéine	Accession	Maladie
<u>ACTG1</u>	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	P63261	Surdité
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P05091	Parkinson
			Alzheimer
ATP5C1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	P36542	Alzheimer
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	Alzheimer
<u>GARS</u>	Glycyl-tRNA synthetase	P41250	Charcot-Marie-Tooth
HDAC1	Histone deacetylase 1	Q13547	Huntington
<u>HEXB</u>	Beta-hexosaminidase subunit beta	P07686	Sandhoff
			Tay-Sachs
HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78/BiP)	P11021	Parkinson
HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial (GRP-75)	P38646	Parkinson
<u>HSPD1</u>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	Sclérose en plaques
			Paralysie spastique
			Alzheimer
<u>LMNA</u>	Lamin-A/C	P02545	Charcot-Marie-Tooth
			Alzheimer
<u>MYH9</u>	Myosin-9	P35579	Surdité
PARP1	Poly [ADP-ribose] polymérase 1 (PARP-1)	P09874	Parkinson
			Alzheimer
PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	Alzheimer
<u>SEPT9</u>	Septin-9	Q9UHD8	Neuropathie du plexus brachial
STMN1	Stathmin	P16949	Sclérose en plaques
<u>TARDBP</u>	TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)	Q13148	Sclérose amyotrophique latérale
			Alzheimer
			Parkinson
TOMM40	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	O96008	Alzheimer
<u>TPM3</u>	Tropomyosin alpha-3 chain	P06753	Myopathie à némaline
VGF	Neurosecretory protein VGF	O15240	Alzheimer

**Tableau R-IV:** Protéines prédites sécrétées identifiées par la méthode iTRAQ comme différentiellement exprimées au sein du sécrétome suite au traitement par l'oxaliplatine (72h) des cellules SH-SY5Y et répertoriées dans la base PPP (Plasma Proteome Project) de l'HUPO.

PS: peptide signal  
VNC: voie non classique

Nom	Numéro d'accèsion	Sécrétion	N° dans la base HPPP
72 kDa type IV collagenase	P08253	PS	265
Cadherin-2	P19022	PS	2777
CD166 antigen	Q13740	PS	386
Collagen alpha-1(III) chain	P02461	PS	869
Contactin-2	Q02246	PS	1760
Cystatin-C	P01034	PS	1872
Dopamine beta-hydroxylase	P09172	PS	126
Dystroglycan	Q14118	PS	1821
EMILIN-1	Q9Y6C2	PS	1550
Fibronectin	P02751	PS	15
Galectin-3-binding protein	Q08380	PS	108
Insulin-like growth factor-binding protein 2	P18065	PS	1214
Lumican	P51884	PS	73
Matrix metalloproteinase-15	P51511	PS	1648
Neural cell adhesion molecule 1	P13591	PS	279
Neural cell adhesion molecule L1	P32004	PS	929
Pigment epithelium-derived factor	P36955	PS	93
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	Q15113	PS	142
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret	P07949	PS	867
Secretogranin-3	Q8W3D2	PS	2796
Serum albumin	P02768	PS	5
SPARC	P09486	PS	235
Alpha-enolase	P06733	VNC	1091
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O75874	VNC	1793
Peroxisredoxin-2	P32119	VNC	404
Transferrin receptor protein 1	P02786	VNC	1702
Tubulin beta-2C chain ; Tubulin beta chain	P68371	VNC	509
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	P09936	VNC	2366
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	P22314	VNC	1774

**Tableau R-V:** Protéines prédites sécrétées identifiées par la méthode iTRAQ comme différentiellement exprimées au sein du sécrétome suite au traitement par l'oxaliplatine (72h) des cellules SH-SY5Y et répertoriées dans les bases de données des maladies humaines OMIM (A) et GAD - Genetic Association Database (B). Les protéines dont les gènes sont soulignés sont répertoriées dans les 2 bases.

# A

Gène	Protéine	Accession	Maladie	Identifiant OMIM gene	maladie
ACTB	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	P60709	Dystonie	*102630	#607371
<u>ACTG1</u>	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	P63261	Surdité	*102560	#604717
AGRN	Agrin	O00468	Myasthénie	*103320	#254300
APP	Amyloid beta A4 protein	P05067	Alzheimer	+104760	#104300
CNTN2	Contactin-2	Q02246	Sclérose en plaques	*190197	#126200
<u>COL6A1</u>	Collagen alpha-1(VI) chain	P12109	Myopathie de Bethlem Myopathie d'Ullrich	*120220	#158810 #254090
<u>CST3</u>	Cystatin-C	P01034	Alzheimer	*604312	%607116
DBH	Dopamine beta-hydroxylase	P09172	Parkinson	*609312	#168600
<u>HSPG2</u>	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	P98160	Syndrome de Schwartz-Jampel	*142461	#255800
<u>UCHL1</u>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	P09936	Parkinson	+191342	#168600

# B

Gène	Protéine	Accession	Maladie
<u>ACTG1</u>	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	P63261	Surdité
ADAM10	ADAM 10	O14672	Sclérose en plaques Alzheimer Creutzfeldt-Jakob
ALB	Serum albumin	P02768	Alzheimer
APP	Amyloid beta A4 protein	P05067	Alzheimer
B2M	Beta-2-microglobulin	P61769	Parkinson
BAT1	Spliceosome RNA helicase BAT1	Q13838	Alzheimer
CDH11	Cadherin-11	P55287	Alzheimer
<u>CNTN2</u>	Contactin-2	Q02246	Polyradiculoneuropathie
<u>COL6A1</u>	Collagen alpha-1(VI) chain	P12109	Alzheimer Myopathie d'Ullrich Sclérose amyotrophique latérale
<u>CST3</u>	Cystatin-C	P01034	Alzheimer
DBH	Dopamine beta-hydroxylase	P09172	Migraine Parkinson Epilepsie Sclérose en plaques
EFNA5	Ephrin-A5	P52803	Parkinson
GOLM1	Golgi membrane protein 1	Q8NBJ4	Alzheimer
<u>HSPG2</u>	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	P98160	Alzheimer
IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2	P18065	Alzheimer
IGFBP4	Insulin-like growth factor-binding protein 4	P22692	Alzheimer
L1CAM	Neural cell adhesion molecule L1	P32004	Sclérose en plaques
MMP2	72 kDa type IV collagenase	P08253	Alzheimer Sclérose en plaques
PIIF	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial	P30405	Alzheimer
PRDX3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	Alzheimer
PSAP	Proactivator polypeptide	P07602	Alzheimer
SORCS1	VPS10 domain-containing receptor SorCS1	Q8WY21	Alzheimer
SPARC	SPARC	P09486	Alzheimer
STMN1	Stathmin	P16949	Sclérose en plaques
TIMP2	Metalloproteinase inhibitor 2	P16035	Alzheimer
TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	P09493	Myopathie à némaline
TPT1	Translationally-controlled tumor protein	P13693	Alzheimer
<u>UCHL1</u>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	P09936	Parkinson Alzheimer
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	P15692	Huntington
VEGF	Neurosecretory protein VGF	O15240	Alzheimer

**Tableau R-VI:** Protéines prédites sécrétées identifiées par la méthode iTRAQ comme sur-exprimées au sein du sécrétome suite au traitement par 1  $\mu$ M d'oxaliplatine (72h) des cellules SH-SY5Y.  
 intrac: protéome intracellulaire  
 sécrét: sécrétome


  
 sur-expression  
 sous-expression  
 sans variation d'expression


  
 PS: peptide signal  
 VNC: voie non classique

Nom	Numero d'accession	Activité biologique (GO)	Expression intrac	Expression secret	Sécrétion	Fonction extracellulaire	Références bibliographiques
Pentidyl-prolyl cis-trans isomerase B (Cyclophilin B)	#P23384PPIB.HUMAN	Recrutement des protéines, chaperone	OX1	OX1	PS	Chimiotaxie adhésion à la MEC	Bukinsky, 2002
Protein disulfide isomerase A3 (ERp57/GRP58)	#P30101PDI.A3.HUMAN	Maturation des protéines, chaperone	OX50	OX1	PS	Régulation du potentiel REDOX extracellulaire	Hirano <i>et al.</i> , 1995; Chignard <i>et al.</i> , 2006
B-cell growth factor 1 (Chromogranin-B)	#P03668CGI.HUMAN	Neurotransmission	OX1	OX1	PS	Neuromodulation (précurseur de neuropeptides)	Marksteiner <i>et al.</i> , 1999
B-cell receptor-associated protein 31 (Bap31)	#P51573BAP31.HUMAN	Transport RE-Golgi, apoptose	OX1/10	OX1/10	PS		
40S ribosomal protein S16	#P62348RS16.HUMAN	Traduction des protéines	OX1	OX1	VNC		
DnaJ homologue subfamily C member 8	#O13837DnajC8.HUMAN	Epissage des AKN	OX1	OX1	VNC		
Endonuclease differentiation-related factor 1	#O08695EDF1.HUMAN	Régulation de la transcription	OX1	OX1	VNC		
Enhancer of rudimentary homolog	#P34695ERH.HUMAN	Régulation du cycle cellulaire	OX1	OX1	VNC		
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial	#P30088PPIB.HUMAN	Maturation des protéines	OX1	OX1	VNC		
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (RKKP)	#P169495PBE1.HUMAN	Signalisation cellulaire	OX1/50	OX1	VNC		
Sirtuinin	#P62328TYB4.HUMAN	Déstabilisation des microtubules	OX1/50	OX1	VNC	Activité anti-apoptotique, neuroprotection	Sun and Kim, 2007
Thymosin beta-4	#A8M406TMSL.HUMAN	Séquestration des monomères d'actine					
Thymosin beta-4-like protein 3	#P99956UCHE1.HUMAN	Carbolisme des protéines		OX1	VNC	Dégradation protéique extracellulaire	Sixt and Dahlmann, 2008
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	#P61361IRIS3.HUMAN	Traduction des protéines		OX1/10	VNC	Prolifération cellulaire	WentQuanz <i>et al.</i> , 1997
40S ribosomal protein S30	#P62138CALM.HUMAN	Activation de cibles dépendantes du calcium	OX50	OX1/10	VNC		
Calmodulin	#P09496CLCA.HUMAN	Endocytose		OX1/10	VNC		
Clathrin light chain A	#P43487RANG.HUMAN	Trafic des protéines	OX1/50	OX1/10	VNC		
Ran-specific GTPase-activating protein (RanBP1)	#P63313TYB10.HUMAN	Séquestration des monomères d'actine	OX5	OX1/10	VNC	Activité anti-apoptotique, neuroprotection	Sun and Kim, 2007
Thymosin beta-10	#P63313TYB10.HUMAN	Transport du calcium, activité anti-apoptotique		OX1/10	VNC	Activité "cytokine-like"	Bommer and Theke, 2004
Translationally-controlled tumor protein (TCTP)	#P13693TCTP.HUMAN			OX1/10	VNC		

**Tableau R-VII:** Protéines identifiées par approche iTRAQ/DIGE-2D comme différentiellement exprimées au sein du protéome intracellulaire suite au traitement par l'oxaliplatine (24h) des cellules SH-SY5Y, impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire.

Nom	Numéro d'accèsion	Expression		Méthode	Activité biologique	Références bibliographiques
		OX5	OX10			
<b>Reconnaissance des dommages à l'ADN et réponse</b>						
Poly [ADP-ribose] polymérase 1 (PARP-1)	P0874F/PAFP_HUMAN			iTRAQ	BER (base-excision repair), apoptos	Dantzer <i>et al.</i> , 2000, Koh <i>et al.</i> , 2005
High mobility group protein B1 (HMGB1)	P09429/HMGB1_HUMAN			iTRAQ	Reconnaissance des adduits du Pt dans l'ADN, BER	Chaney <i>et al.</i> , 2005
High mobility group protein B2 (HMGB2)	P26583/HMGB2_HUMAN			iTRAQ	Reconnaissance des adduits du Pt dans l'ADN, BER	Chaney <i>et al.</i> , 2005
DNA mismatch repair protein Msh2	P43246/MSH2_HUMAN			DIGE-2D	Reconnaissance des adduits du Pt dans l'ADN	Chaney <i>et al.</i> , 2005
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)	P8527/PRKDC_HUMAN			iTRAQ	Réparation des cassures double-brin de l'ADN	An <i>et al.</i> , 2010
Bifunctional polynucleotide phosphorylase-kinase	Q96760/PNKP2_HUMAN			DIGE-2D	BER (base-excision repair)	Martin <i>et al.</i> , 2008
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial (AIF)	Q95831/AIFM1_HUMAN			DIGE-2D	Fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose	Susin <i>et al.</i> , 1999, Cregan <i>et al.</i> , 2002
<b>Synthèse des nucléotides</b>						
Adenylate kinase isoenzyme 5	Q9Y6K8/KAD5_HUMAN			DIGE-2D	Biosynthèse des nucléobases et nucléotides	Dzeja <i>et al.</i> , 2009
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	P12248/IMDH2_HUMAN			DIGE-2D	Biosynthèse des nucléobases et nucléotides	Pumkin <i>et al.</i> , 2008
<b>Translocation nucléaire</b>						
GTP-binding nuclear protein Ran	P62856/RAN_HUMAN			DIGE-2D	Trafic nucléocytoplasmique des protéines	Knudsen <i>et al.</i> , 2009
<b>Remodelage de la chromatine</b>						
Histone deacetylase 1	Q13547/HDAC1_HUMAN			iTRAQ	Compaction de la chromatine (désacétylation des histones)	Schrump, 2009
Nucleophosmin	P06748/NPM_HUMAN			D/i	Assemblage des nucléosomes	Gadad <i>et al.</i> , 2009
Histone H2B type 1-B (H2B.6) (H2B.f) (H2B.1)	P33778/H2B1B_HUMAN			iTRAQ	Positionnement des nucléosomes	
Histone H2A type 2-A (H2A.2)	Q6F113/H2A2A_HUMAN			iTRAQ	Positionnement des nucléosomes	
RuvB-like 1	Q9Y265/RUVB1_HUMAN			DIGE-2D	Relaxation de la chromatine (acétylation des histones)	Jha <i>et al.</i> , 2009
<b>Régulation de l'expression génique</b>						
TATA-binding protein-associated factor 2N	Q92804/RBP56_HUMAN			iTRAQ	Initiation de la transcription	
CCAAT/enhancer-binding protein zeta	Q03701/CEBPZ_HUMAN			iTRAQ	Régulation de la transcription	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Q99729/R0A3A_HUMAN			D/i	Régulation de la transcription	
PC4 and SFK51-interacting protein	O75475/PSPL_HUMAN			iTRAQ	Régulation de la transcription	
Interleukin enhancer-binding factor 2	Q12905/ILF2_HUMAN			iTRAQ	Régulation de la transcription	
Interleukin enhancer-binding factor 3	Q12906/ILF3_HUMAN			DIGE-2D	Régulation de la transcription	
Nuclear protein Hcc-1	P82979/HCC1_HUMAN			DIGE-2D	Régulation de la transcription	
TAR DNA-binding protein 43	Q13148/TADBP_HUMAN			DIGE-2D	Régulation de la transcription et de l'épissage des ARNm	
Nuclease sensitive element-binding protein 1	P67897/YBOX1_HUMAN			iTRAQ	Epissage des ARNm	
RNA-binding protein FUS	P33637/FUS_HUMAN			iTRAQ	Epissage des ARNm	
U1 small nuclear ribonucleoprotein A	P08012/NSRPA_HUMAN			iTRAQ	Epissage des ARNm	
Splicing factor 3B subunit 3	Q15381/SF3B3_HUMAN			iTRAQ	Epissage des ARNm	
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	P23246/SFPQ_HUMAN			iTRAQ	Epissage des ARNm	
Splicing factor, arginine/serine-rich 1	Q07955/SF2K1_HUMAN			iTRAQ	Epissage des ARNm	
<b>Facteurs de croissance</b>						
Neurosecretory protein VGF	O15240/VGF_HUMAN			DIGE-2D	Neurogenèse	Thakker-Vaia <i>et al.</i> , 2009
Hepatoma-derived growth factor (HDGF)	P31858/HDGF_HUMAN			iTRAQ	Prolifération	
<b>Régulation de la division cellulaire</b>						
Calmodulin (CaM)	P62158/CALM_HUMAN			iTRAQ	Activation de la CaM Kinase II pour phosphoryler Cdc25C	Pael <i>et al.</i> , 1999
Nucleolin	P19338/NUCL_HUMAN			D/i	Ségrégation des chromosomes	Li <i>et al.</i> , 2009
Nucleophosmin	P06748/NPM_HUMAN			D/i	Ségrég. des chrom., contrôle de l'act. transcription. de p53	Amin <i>et al.</i> , 2008, Maisnel <i>et al.</i> , 2004
Stathmin (Op18)	P16949/STAM1_HUMAN			D/i	Régulation du fuseau mitotique	Johansen <i>et al.</i> , 2000
Septine-9	Q9UH88/SEPT9_HUMAN			DIGE-2D	Cytokinèse	Silveman-Gavriela <i>et al.</i> , 2008
Septine-11	Q9NTVA/SEPT11_HUMAN			DIGE-2D	Cytokinèse	Silveman-Gavriela <i>et al.</i> , 2008
Septine-2 (Protein NEDD5)	Q15019/SEPT2_HUMAN			DIGE-2D	Cytokinèse	Silveman-Gavriela <i>et al.</i> , 2008
Septine-7	Q16181/SEPT7_HUMAN			iTRAQ	Cytokinèse	Silveman-Gavriela <i>et al.</i> , 2008
ADP-ribosylation factor-like protein 3 (Arf3)	P36405/ARL3_HUMAN			DIGE-2D	Cytokinèse	Zhou <i>et al.</i> , 2006



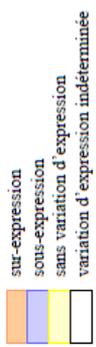
**Tableau R-VIII:** Protéines identifiées par approche iTRAQ/DIGE-2D comme différentiellement exprimées au sein du protéome intracellulaire suite au traitement par l'oxaliplatine (24h) des cellules SH-SY5Y, impliquées dans la réponse au stress oxydatif et dans le métabolisme énergétique.

Nom	Numéro d'accèsion	Expression		Méthode	Activité biologique	Références bibliographiques
		OX5	OX10			
<p>D1 : DIGE-2D et iTRAQ</p> <p> <span style="display:inline-block; width:10px; height:10px; background-color:blue; border:1px solid black;"></span> sur-expression  <span style="display:inline-block; width:10px; height:10px; background-color:yellow; border:1px solid black;"></span> sous-expression  <span style="display:inline-block; width:10px; height:10px; background-color:orange; border:1px solid black;"></span> sans variation d'expression  <span style="display:inline-block; width:10px; height:10px; background-color:white; border:1px solid black;"></span> variation d'expression indéterminée                 </p>						
<b>Glycolyse</b>						
6-phosphofructokinase	Q01813 K6FP_HUMAN	Orange	Orange	D1 DIGE-2D iTRAQ	Glycolyse	Chuang <i>et al.</i> , 2005
Fructose-bisphosphate aldolase A	P40750 ALDOA_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D iTRAQ	Glycolyse	
Triosephosphate isomerase	P60174 TPI1_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D iTRAQ	Glycolyse	
Alpha-enolase	P06733 ENO1_HUMAN	Orange	Orange	D1	Glycolyse	
Phosphoglycerate mutase 1	P18669 PGAM1_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Glycolyse	
Phosphoglycerate kinase 1	P00538 PGK1_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Glycolyse	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406 G3P_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Glycolyse, apoptose	
<b>Métabolisme des lipides</b>						
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	P49748 ACADV_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Dégradation des acides gras	
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	P24732 THL1_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Dégradation des acides gras	
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	P55084 ECHB_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Dégradation des acides gras	
<b>Cycle de Krebs</b>						
Citrate synthase, mitochondrial	O75390 CS1Y_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Cycle de Krebs	
Malate dehydrogenase, mitochondrial	P49926 MdhM_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Cycle de Krebs	
<b>Phosphorylation oxydative</b>						
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705 ATPA_HUMAN	Orange	Orange	D1	Synthèse de l'ATP	
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576 ATPB_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Synthèse de l'ATP	
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	P36642 ATPG_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Synthèse de l'ATP	
ATPase inhibitor, mitochondrial	Q9U2E2 ATIF1_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Inhibition de l'activité ATP synthase	
<b>Réplication de l'ADN mitochondrial</b>						
Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial mtSSB	Q04837 SSBP_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Réplication de l'ADN mitochondrial	Longlevy <i>et al.</i> , 2009
<b>Import et rempliment des protéines mitochondriales</b>						
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	O96008 TOM40_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Import des précurseurs protéiques dans la mitochondrie	Becker <i>et al.</i> , 2010
60 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp60)	P11089 CH60_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Rempliment des protéines mitochondriales	Wang <i>et al.</i> , 2000, Martin <i>et al.</i> , 1997
Stress-70 protein, mitochondrial (GRP-75)	P38646 GRP75_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Rempliment des protéines mitochondriales	Martin <i>et al.</i> , 1997
Prohibitin	P35232 PHEB_HUMAN	Orange	Orange	D1	Rempliment des protéines mitochondriales	Nijtmans <i>et al.</i> , 2002
<b>Système anti-oxydant</b>						
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial (AIF)	O95831 AIFM1_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Fragmentation de l'ADN (apoptose), homéostasie rédox	Susan <i>et al.</i> , 1999, Reix <i>et al.</i> , 2007
Thioredoxin domain-containing protein 1	Q9H5N1 TXND1_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Echange thiol / disulfure	Montichard <i>et al.</i> , 2009
Thioredoxin-dependent peroxidase reductase, mitochondrial	P30048 PRDX3_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Echange thiol / disulfure	Montichard <i>et al.</i> , 2009
Peroxi-redoxin-1 (Thioredoxin peroxidase 2)	Q06830 PRDX1_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Echange thiol / disulfure	Montichard <i>et al.</i> , 2009
Prohibitin	P35232 PHEB_HUMAN	Orange	Orange	D1	Activation transcriptionnelle de gènes antioxydants	Theiss <i>et al.</i> , 2009, Liu <i>et al.</i> , 2009

**Tableau R-IX:** Protéines identifiées par approche iTRAQ/DIGE-2D comme différentiellement exprimées au sein du protéome intracellulaire suite au traitement par l'oxaliplatine (24h) des cellules SH-SY5Y, impliquées dans la réponse au stress protéotoxique et dans la résistance multidrogue.

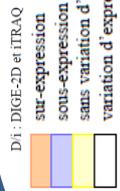
Nom	Numéro d'accèsion	Expression OX5 OX10 OX50	Méthode	Activité biologique	Références bibliographiques
<b>Synthèse des protéines</b>					
Bystin	Q13895 BYST_HUMAN		iTRAQ	Assemblage des ribosomes, traitement des ARN;	Miyoshi et al., 2007
Nucleolin	P19398 NUCL_HUMAN		D/i	Biogenèse et assemblage des ribosomes	Ginsbury et al., 1999
60S acidic ribosomal protein P2	P03578 RLA3_HUMAN		iTRAQ	Traduction	
60S ribosomal protein L3	P39023 RL3_HUMAN		iTRAQ	Traduction	
40S ribosomal protein S12	P25398 RS12_HUMAN		D/i	Traduction	
Glycyl-tRNA synthetase	P41250 SYG_HUMAN		iTRAQ	Traduction	
Elongation factor 1-alpha 1	P68104 EF1A1_HUMAN		iTRAQ	Traduction	
Translational activator GCN1	Q92616 GCN1L_HUMAN		iTRAQ	Traduction	
Adenosylhomocysteinase	P23576 64AH_HUMAN		DIGE-2D	Biosynthèse de l'acide aminé L-homocystéine	Tabatabaie et al., 2009
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH)	O43175 SBEA_HUMAN		iTRAQ	Biosynthèse de l'acide aminé L-sérine	
<b>Traffic intracellulaire des protéines</b>					
Coatomer subunit alpha	P53621 COPIA_HUMAN		iTRAQ	Formation des vésicules intracellulaires	Lee et al., 2010
ADP-ribosylation factor-like protein 3 (ARL3)	P36405 ARL3_HUMAN		DIGE-2D	Régulation du transport intracellulaire des vésicules	Jackson et al., 2003
<b>Maturation des protéines: glycosylation et repliement</b>					
Neutral alpha-glucosidase AB (Glycosidase II subunit alpha)	Q14697 GANAAB_HUMAN		iTRAQ	N-glycosylation des chaînes polypeptidiques naissantes	Ruddock et al., 2006
78 kDa glucose-regulated protein (grp78/Bip)	P11021 GRP78_HUMAN		D/i	Repliement des protéines dans le RE	Kum et al., 2008
Endoplasmic reticulum protein disulfide-isomerase A3 (ERp60)	P14625 ENPLA3_HUMAN		D/i	Repliement des protéines dans le RE	Kum et al., 2008
DnaJ homolog subfamily A member 1	P30101 FDJA3_HUMAN		iTRAQ	Formation des ponts disulfures	
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A)	P31469 DNI1A_HUMAN		iTRAQ	Repliement des protéines dans le RE	Vos et al., 2008
Heat shock cognate 71 kDa protein	P60957 HSPA71_HUMAN		DIGE-2D	Repliement des protéines en dehors du RE	
Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142 HSP7C_HUMAN		iTRAQ	Chaperone	
<b>ERAD (ER-associated protein degradation)</b>					
Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP/p97)	P55072 TERA_HUMAN		DIGE-2D	Extraction des protéines mal repliées du RE	Zhong et al., 2006
<b>UPS (Ubiquitin-proteasome system)</b>					
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	Q13300 PSE14_HUMAN		D/i	Catabolisme des protéines	
<b>Résistance multidrogue</b>					
40S ribosomal protein S4 (Multidrug resistance-associated protein MGr1-Ae)	P08865 RSSA_HUMAN		DIGE-2D	Résistance multidrogue	Shi et al., 2002; Sun et al., 2006

D/i : DIGE-2D et iTRAQ



**Tableau R-X:** Protéines identifiées par approche iTRAQ/DIGE-2D comme différentiellement exprimées au sein du protéome intracellulaire suite au traitement par l'oxaliplatine (24h) des cellules SH-SY5Y, impliquées dans la plasticité neuronale et dans l'homéostasie calcique.

Nom	Numéro d'accèsion	Expression		Méthode	Activité biologique	Références bibliographiques
		OX5	OX10			
<b>Dynamique des microtubules</b>						
Tubulin beta chain	P07457/TBB8_HUMAN	Orange	Orange	D/i	Formation des microtubules	Brackley et al., 2009
T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta)	P78371/TCPB_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Replètement de la tubuline	Greningloh et al., 2004
Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	P46821/MAP1B_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Stabilisation des microtubules	
Stathmin (Op18)	P16949/STAMN1_HUMAN	Orange	Orange	D/i	Déstabilisation des microtubules	
<b>Plasticité synaptique</b>						
Synaptopodin-2	Q9D4S6/SYTP2_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Plasticité postsynaptique	Reddy et al., 2005
Neuromodulin (Axonal membrane protein GAP-43)	P17679/NEOM_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Plasticité présynaptique	Reddy et al., 2005
Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM-1)	P15391/NCAM1_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Adhérence neurone-neurone	Kuss et al., 2001
Neurosecretory protein VGF	O15240/VGF_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Synaptogénèse, neuroprotection	Alder et al., 2003
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (RACK1)	P63244/GBLP_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Signalisation impliquant la PKC (Protein kinase C)	Sklan et al., 2006, Brandon et al., 2002
<b>Remodelage du cytosquelette d'actine</b>						
Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	P63261/ACTG_HUMAN	Orange	Orange	D/i	Formation des microfilaments d'actine	
F-actin-capping protein subunit alpha-1	P29070/CAZAL_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Régulation de la polymérisation des microfilaments d'actine	Courson et al., 2010
Fascin	Q16658/FSCN1_HUMAN	Orange	Orange	D/i	Assemblage des microfilaments d'actine	Wang et al., 2008
Myosin-10 (Non-muscle myosin heavy chain B)	P35580/MYH10_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Stabilisation des microfilaments d'actine	Wang et al., 2008
Tropomyosin alpha-4 chain (Tropomyosin-4)	P67936/TPM4_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Stabilisation des microfilaments d'actine	Wang et al., 2008
Caldesmon	Q05682/CALD1_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Régulation des interactions actine-myosine (actomyosine)	Maunherz et al., 2009
Thymosin beta-10	P63113/TYB10_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Séquestration des monomères d'actine	Maunherz et al., 2009
Thymosin beta-4	P63338/TYB4_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Séquestration des monomères d'actine	Bertling et al., 2004
Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1)	Q01518/CAP1_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Régulation de la dynamique des microfilaments d'actine	
<b>Interface cytosquelette d'actine / membrane plasmique</b>						
Ezrin	P15311/EZR1_HUMAN	Orange	Orange	D/i	Ancrage des microfilaments à la membrane plasmique	Turunen et al., 1994, Fehon et al., 2010
Moessin	P26038/MOES_HUMAN	Orange	Orange	D/i	Ancrage des microfilaments à la membrane plasmique	Fehon et al., 2010
Radixin	P35241/RADI_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Ancrage des microfilaments à la membrane plasmique	Fehon et al., 2010
Spectrin beta chain, brain 1	Q01082/SPTB2_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Ancrage des microfilaments à la membrane plasmique	Suzuki et al., 2008
Spectrin alpha chain, brain	Q13813/SPTA2_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Mouvement du cytosquelette à la membrane	Suzuki et al., 2008
Filamin-A	P31333/FILNA_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Ancrage des microfilaments à la membrane plasmique	Popowicz et al., 2006
Filamin-B	O75369/FILNB_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Ancrage des microfilaments à la membrane plasmique	Popowicz et al., 2006
<b>Homéostasie du calcium</b>						
78 kDa glucose-regulated protein (grp78/Bip)	P11021/GRP78_HUMAN	Orange	Orange	D/i	Effet "tampon"	Benidge et al., 2003
Endoplasmic (grp94)	P14625/ENPF_HUMAN	Orange	Orange	D/i	Effet "tampon"	Benidge et al., 2003
Annexin A2 (Annexin II)	P07355/ANXA2_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Activation de cibles dépendantes du calcium	Benidge et al., 2003
Protein S100-A10	P60903/S10A4_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Activation de cibles dépendantes du calcium	Benidge et al., 2003
Calmodulin (CaM)	P61238/CALM_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Activation de cibles dépendantes du calcium	Lukas et al., 1988
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aarlar2	Q9D503/CMC2_HUMAN	Orange	Orange	DIGE-2D	Signalisation calcium-dépendante mitochondriale	Pardo et al., 2009
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	Q09666/AHNK_HUMAN	Orange	Orange	iTRAQ	Liaison du cytosquelette d'actine au canal calcium	Shao et al., 2009, Komuro et al., 2003



**Annexe 2:** Protéines identifiées par la méthode DIGE-2D entre pH 4-7, comme différentiellement exprimées au sein du protéome intracellulaire suite au traitement par l'oxaliplatine (24h) des cellules SH-SY5Y.

PS: peptide signal  
 VNC: voie non classique

\* : protéines possédant la séquence KDEL

Spot	Nom	Accession	Ratio OXI0/CTRL	Anova p	MW	pI	Sécrétion
ACTG	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN	1,427	3,300E-02	42108	5,31	VNC
CALD1	Caldesmon	CALD1_HUMAN	-1,331	9,547E-04	93251	5,63	NS
CAZA1	F-actin capping protein subunit alpha-1	CAZA1_HUMAN	1,537	1,700E-02	33073	5,45	NS
ENPL	Endoplasmic precursor	ENPL_HUMAN	-1,309	1,800E-02	92696	4,76	PS *
GANAB	Neutral alpha-glucosidase AB precursor	GANAB_HUMAN	-1,432	6,821E-04	107263	5,74	PS
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein precursor	GRP78_HUMAN	-1,302	1,800E-02	72402	5,07	PS *
MSH2	DNA mismatch repair protein Msh2	MSH2_HUMAN	-1,360	3,000E-03	105418	5,58	NS
NPM	Nucleophosmin	NPM_HUMAN	-1,284	1,700E-02	32726	4,64	VNC
NUCL	Nucleolin	NUCL_HUMAN	-1,365	2,000E-03	76625	4,6	NS
PHB	Prohibitin	PHB_HUMAN	1,497	6,000E-03	29843	5,57	PS
TERA	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN	-1,359	1,400E-02	89950	5,14	NS
VGf	Neurosecretory protein VGF precursor	VGf_HUMAN	-1,283	3,900E-02	67304	4,75	PS
VIME1	Vimentin	VIME_HUMAN	1,839	1,000E-03	53676	5,06	VNC
VIME2	Vimentin	VIME_HUMAN	1,776	5,000E-02	53676	5,06	VNC
VIME3	Vimentin	VIME_HUMAN	1,749	1,900E-02	53676	5,06	VNC
VIME4	Vimentin	VIME_HUMAN	1,781	2,400E-02	53676	5,06	VNC
VIME5	Vimentin	VIME_HUMAN	1,518	7,000E-03	53676	5,06	VNC

**Annexe 3: Protéines identifiées par la méthode DIGE-2D entre pH 3-11 (séparation non linéaire), comme différenciellement exprimées au sein du protéome intracellulaire suite au traitement par l'oxaliplatine (24h) des cellules SH-SY5Y.**

N° spot	Nom	Accession	Ratio OX10/CTRL	Ratio OX50/CTRL	Ratio OX10/CTRL	Ratio OX50/CTRL	Anova p	MW	pI	Sécrétion	Nb peptides	Protein Score C.I. %
9	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN	1.440	1.885	3.096	3.259E-06	22374	8,27	VNC	13	100,000	
14	Adenylyl kinase isoenzyme 5	KAD5_HUMAN	1.322	1.807	2.695	8,816E-06	96790	5,38	NS	9	100,000	
20	Far upstream element-binding protein 1	FUSP1_HUMAN	-1.416	-1.759	-2.391	4,413E-05	67680	7,18	NS	21	100,000	
25	Fascin	FSCN1_HUMAN	1.352	1.713	2.279	1,625E-04	55123	6,84	NS	21	100,000	
27	NADPH adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	ADRX_HUMAN	1.870	2.112	2.255	6,324E-09	54259	8,72	PS	26	100,000	
31	Adenosylhomocysteinase	SAHH_HUMAN	1.505	1.813	2.175	4,856E-04	48255	5,92	VNC	12	100,000	
32	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha	LAP2A_HUMAN	-1.582	-1.728	-2.171	2,979E-03	78016	7,56	NS	11	99,963	
33	Srathmin	STMN1_HUMAN	-1.241	-1.620	-2.147	4,847E-03	17303	5,76	VNC	11	99,973	
34	RuvB-like 1	RUVBL1_HUMAN	1.297	1.638	2.146	3,220E-07	50538	6,18	NS	11	100,000	
36	Far upstream element-binding protein 1	FUSP1_HUMAN	-1.344	-1.684	-2.103	7,944E-05	67680	7,12	NS	23	100,000	
39	Septin-9	SEPT9_HUMAN	-1.436	-1.668	-2.060	8,514E-07	65646	9,06	VNC	23	100,000	
42	Nuclear protein Hcc-1	HCC1_HUMAN	-1.281	-1.461	-2.000	5,695E-04	23713	6,1	NS	9	100,000	
50	Adenylyl cyclase-associated protein 1	ACAP1_HUMAN	-1.384	-1.547	-1.940	9,963E-04	52222	8,27	NS	14	100,000	
56	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRNP_HUMAN	-1.446	-1.604	-1.897	8,693E-04	36704	9,04	NS	9	100,000	
58	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRNP_HUMAN	-1.255	-1.429	-1.861	1,281E-05	71184	8,23	NS	22	100,000	
61	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMAN	-1.201	-1.331	-1.840	1,092E-02	28900	6,67	NS	16	100,000	
63	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PP1A_HUMAN	1.192	1.470	1.838	1,050E-03	18229	7,68	NS	4	99,989	
69	6-phosphofruktokinase, muscle type	KPF_HUMAN	-1.320	-1.334	-1.770	5,370E-05	88984	8,23	NS	19	100,000	
70	Adenylyl kinase isoenzyme 5	KAD5_HUMAN	1.325	1.648	1.770	1,038E-03	22358	5,38	NS	9	97,451	
72	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17_HUMAN	-1.190	-1.338	-1.759	6,348E-05	72953	8,82	NS	23	100,000	
74	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNP_HUMAN	-1.252	-1.397	-1.747	5,450E-07	38581	7,62	NS	15	100,000	
75	Septin-11	SEPT11_HUMAN	-1.229	-1.392	-1.741	2,268E-04	48952	6,32	NS	17	100,000	
82	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Amlar2	CAC2_HUMAN	-1.150	-1.325	-1.686	4,572E-06	74528	8,79	NS	17	100,000	
86	Septin-2	SEPT2_HUMAN	-1.201	-1.311	-1.666	1,860E-04	41689	6,15	NS	21	100,000	
87	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3_HUMAN	-1.207	-1.383	-1.660	1,392E-02	95678	8,86	NS	21	100,000	
88	Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRG47_HUMAN	-1.210	-1.270	-1.657	2,436E-06	64004	8,55	VNC	11	100,000	
94	Tubulin beta chain	TUBB1_HUMAN	1.268	1.642	1.642	6,038E-06	50995	4,78	NS	24	100,000	
99	Trioemphosphate isomerase	TPI1_HUMAN	-1.109	-1.231	-1.640	1,235E-02	26938	6,45	NS	21	100,000	
105	Glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAP_HUMAN	-1.192	-1.202	-1.615	7,145E-06	36201	8,57	VNC	14	100,000	
115	Thioredoxin-dependent peroxidoreductase, mitochondrial	PRDX3_HUMAN	-1.180	-1.266	-1.593	1,404E-05	28017	7,67	VNC	6	100,000	
126	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNP_HUMAN	-1.298	-1.368	-1.565	1,089E-03	38581	7,62	NS	19	100,000	
131	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN_HUMAN	1.081	1.354	1.548	6,311E-03	24570	7,01	VNC	14	100,000	
132	ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1_HUMAN	-1.173	-1.310	-1.538	1,976E-06	83349	6,81	NS	30	100,000	
135	40S ribosomal protein S4	RPS4_HUMAN	-1.163	-1.329	-1.532	0,832E-09	33047	4,79	VNC	13	100,000	
141	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A_HUMAN	1.225	1.360	1.527	5,884E-05	59828	6,16	VNC	23	100,000	
143	40S ribosomal protein S12	RPS12_HUMAN	-1.199	-1.268	-1.511	2,498E-04	14268	6,3	VNC	7	100,000	
148	Fascin	FSCN1_HUMAN	1.209	1.344	1.500	1,044E-03	55123	6,84	NS	27	100,000	
148	Galectin-3	LGALS3_HUMAN	1.051	1.046	-1.419	1,485E-03	26239	8,58	VNC	7	100,000	
170	Glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAP_HUMAN	-1.174	-1.216	-1.496	1,532E-03	36239	8,57	NS	7	100,000	
177	Triosephosphate isomerase	TPI1_HUMAN	-1.074	-1.150	-1.451	1,331E-03	26938	6,47	NS	19	100,000	
178	Very-long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADVL_HUMAN	-1.265	-1.450	-1.312	0,640E-03	70745	8,92	PS *	11	99,767	
180	Septin 11 precursor	SEPT11_HUMAN	-1.088	-1.273	-1.438	8,692E-03	46525	8,75	NS	10	99,912	
181	Mitochondrial 39S ribosomal protein L30	RPL30_HUMAN	-1.093	-1.246	-1.435	8,692E-06	37110	7,06	NS	11	100,000	
184	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	AIFM1_HUMAN	-1.091	-1.171	-1.432	9,921E-06	31908	8,45	NS	11	99,995	
185	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	HNRNP_Q_HUMAN	-1.138	-1.231	-1.421	9,341E-06	69788	8,68	NS	25	100,000	
187	Single-strand DNA-binding protein, mitochondrial	SSB_HUMAN	-1.107	-1.179	-1.420	7,233E-04	17249	8,59	VNC	9	100,000	
187	Glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAP_HUMAN	-1.107	-1.261	-1.417	1,538E-03	36201	8,57	NS	13	100,000	
188	Urate synthase, mitochondrial	URAT1_HUMAN	-1.145	-1.266	-1.414	1,907E-04	34726	5,06	PS	14	100,000	
190	50S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	PSMD14_HUMAN	-1.146	-1.244	-1.414	2,409E-03	34726	5,06	VNC	16	100,000	
192	Ezrin	EZRIN_HUMAN	-1.043	-1.042	-1.414	2,213E-03	69484	5,94	VNC	5	100,000	
196	Fructose-bisphosphate aldolase A	PFKP_HUMAN	-1.043	-1.042	-1.411	2,213E-03	69484	5,94	VNC	19	100,000	
199	Dansinogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	DAI1_HUMAN	-1.043	-1.100	-1.402	1,213E-03	39851	8,3	NS	13	100,000	
206	Bifunctional poly(ADP-ribose) polymerase kinase	PALB1_HUMAN	-1.080	-1.160	-1.405	6,237E-04	44995	8,06	NS	13	100,000	
207	ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1_HUMAN	-1.300	-1.227	-1.392	0,375E-03	37534	8,75	NS	18	100,000	
211	E3 ubiquitin-protein ligase, mitochondrial	FBX_HUMAN	-1.144	-1.227	-1.391	1,057E-05	83349	6,81	NS	30	100,000	
221	FAK DNA-binding protein 45	FDP45_HUMAN	-1.188	-1.139	-1.359	1,131E-02	28495	8,3	PS	9	99,985	
222	Glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAP_HUMAN	-1.136	-1.244	-1.357	5,061E-03	36201	8,57	NS	10	100,000	
225	Far upstream element-binding protein 3	FUSP3_HUMAN	-1.130	-1.190	-1.351	9,973E-03	61944	8,6	NS	8	100,000	
227	Phosphoglycerate kinase 1	PFKP_HUMAN	-1.077	-1.194	-1.349	2,421E-03	44983	8,3	NS	15	100,000	
228	ADP-ribosylation factor-like protein 3	ARL3_HUMAN	1.089	1.348	1.056	4,323E-03	20614	6,74	VNC	7	99,981	
229	Nucleic acid-binding domain, mitochondrial	NAB1_HUMAN	-1.081	-1.133	-1.347	1,474E-03	35965	8,92	VNC	12	100,000	
231	Tubulin alpha-1b/ubiquitin chain	TUBA1B_HUMAN	-1.245	-1.146	-1.346	2,892E-03	30804	4,94	NS	11	100,000	
233	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNP_HUMAN	-1.116	-1.205	-1.345	3,984E-04	38581	7,62	NS	15	100,000	
235	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1_HUMAN	-1.147	-1.161	-1.341	2,672E-04	45456	6,63	VNC	13	100,000	
236	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2_HUMAN	-1.131	-1.099	-1.336	9,003E-03	56859	6,63	VNC	21	100,000	
237	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	IMDH2_HUMAN	1.167	1.242	1.336	2,862E-04	56226	6,44	NS	24	100,000	
241	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	PAF1B_HUMAN	1.090	1.168	1.325	1,651E-02	25724	3,57	NS	7	100,000	
249	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNP_L_HUMAN	-1.064	-1.161	-1.305	1,510E-03	60719	6,65	NS	24	100,000	
250	T-complex protein 1 subunit beta	TCF1B_HUMAN	1.075	1.133	1.303	1,043E-02	57794	6,01	NS	25	100,000	
253	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3_HUMAN	-1.079	-1.090	-1.302	8,670E-03	95678	8,86	NS	26	100,000	

PS: peptide signal  
VNC: vote non classique

\* : protéines possédant la séquence KDEL

**Annexe 4: Protéines identifiées par la méthode iTRAQ comme différentiellement exprimées au sein du protéome intracellulaire suite au traitement par l'oxaliplatine (24h) des cellules SH-SY5Y.**

Nom	Accession	Ratio iTRAQ		Intervalle crédible b. inférieure	Nb peptides	Nb spectres	Séretion
		mojeane	meane				
14-3-3 protein epsilon	P625814I3EHUMAN	OX50	0.784	0.651	7	10	NS
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Q13200P5MD2HUMAN	OX50	1.21	1.02	7	20	NS
40S ribosomal protein S12	P25988S12HUMAN	OX50	0.83	0.698	5	29	VNC
40S ribosomal protein S23	P62566S23HUMAN	OX50	1.25	1.02	6	6	NS
60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	P10809CH60HUMAN	OX10	1.10	1.20	45	250	NS
		OX50	1.36	1.25	45	250	NS
60S acidic ribosomal protein P2	P05387RLA2HUMAN	OX10	0.824	0.825	8	69	NS
		OX50	0.812	0.696	8	69	NS
60S ribosomal protein L15	P61131RL15HUMAN	OX10	0.836	0.712	8	26	NS
60S ribosomal protein L3	P39023RL3HUMAN	OX10	0.837	0.733	17	47	VNC
		OX50	0.865	0.867	17	47	VNC
60S ribosomal protein L32	P63509RL32HUMAN	OX10	0.77	0.639	2	15	NS
60S ribosomal protein L38	P63173RL38HUMAN	OX10	0.751	0.608	5	15	VNC
6-phosphofruktokinase type C	O01837K6P9HUMAN	OX10	0.82	0.681	6	11	VNC
78 kDa glucose-regulated protein precursor	P11011GR78HUMAN	OX50	1.09	1.01	44	268	PS *
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	O98771DAN32HUMAN	OX50	1.24	1.02	3	14	NS
Actin, aortic smooth muscle	P63736ACTAHUMAN	OX50	1.19	1.00	3	31	VNC
Actin, cytoplasmic 2	P63261ACT2HUMAN	OX5	1.15	1.04	18	377	VNC
Actin, cytoplasmic 1	P63261ACT1HUMAN	OX50	1.13	1.02	30	415	VNC
Actin, gamma-enteric smooth muscle	P63267ACTEHUMAN	OX10	1.27	1.05	4	22	VNC
Actin, beta-enteric smooth muscle	P63267ACTBHUMAN	OX10	1.27	1.05	4	22	VNC
Alpha-enolase	P06738ENOA2HUMAN	OX50	0.836	0.748	24	137	VNC
Annexin A2	P07353ANXA2HUMAN	OX10	1.14	1.02	19	111	VNC
ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor	P26340ATPGHUMAN	OX10	0.83	0.69	5	16	NS
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	P25705ATPAHUMAN	OX50	1.17	1.05	24	116	VNC
ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	P66756ATPBHUMAN	OX50	1.13	1.03	58	240	VNC
ATPase Family A-A1, domain-containing protein 3B	O57944ATD3BHUMAN	OX50	1.24	1.01	1	6	NS
ATPase inhibitor, mitochondrial precursor	O97104ITPHUMAN	OX50	0.768	0.649	7	19	PS
Beta-1-antagonist factor	O5531BAFHUMAN	OX50	1.18	1.01	1	42	VNC
Beta-1-oxoacid dehydrogenase beta chain precursor	P07866BFX2HUMAN	OX10	0.689	0.550	4	5	VNC
Bixin	O13889BIX2HUMAN	OX50	0.829	0.689	5	12	VNC
Calsin	P03588CALHUMAN	OX50	0.525	0.53	3	30	VNC
CCAAT/enhancer binding protein zeta	O37071CEBZ2HUMAN	OX50	0.76	0.70	7	9	VNC
Coagulation factor V precursor	P12599FA5HUMAN	OX50	1.57	1.24	3	15	PS
Condenser subunit alpha	O3611COBAHUMAN	OX10	0.843	0.721	10	20	NS
Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2	P316H1CHCH2HUMAN	OX10	0.722	0.579	3	5	VNC
Cold-inducible RNA-binding protein	Q14011CIB2HUMAN	OX50	0.805	0.651	3	5	VNC
Collagen alpha 1(III) chain precursor	P02461COA1HUMAN	OX50	0.524	0.696	7	16	PS
Creatine Kinase B-type	P12777KCRBHUMAN	OX10	0.749	0.625	10	19	NS
		OX50	1.28	1.09	10	19	NS
		OX10	1.37	1.16	10	19	NS
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	O43175SER4HUMAN	OX10	1.19	1.01	7	40	NS
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	P78571PRKDC2HUMAN	OX50	0.905	0.83	54	129	nota déterminé
DnaJ homolog subfamily A member 1	P31469DNAJ1HUMAN	OX50	1.23	1.06	142	29	NS
Elongation factor 1-alpha 1	P48004EFA1HUMAN	OX10	1.13	1.06	10	29	NS
Endoplasmic precursor	P14635ENPHUMAN	OX50	1.09	1.08	17	83	NS
Fc gamma R1	P15311FEZRHUMAN	OX50	0.84	0.721	32	178	PS *
Fascin	Q16693FSCN1HUMAN	OX10	1.15	1.01	11	30	VNC
		OX50	1.22	1.08	17	55	NS
Fibrinogen beta chain precursor	P02675FBB2HUMAN	OX5	0.69	0.587	10	29	PS
		OX10	0.716	0.612	10	29	PS
Fibronectin precursor	P02751FNC2HUMAN	OX5	0.777	0.662	10	29	PS
		OX10	0.733	0.658	27	88	PS
		OX50	0.684	0.613	27	88	PS
		OX10	0.77	0.688	27	88	PS
		OX50	1.07	1.00	92	362	NS
Filamin-A	P21333FILA2HUMAN	OX50	1.08	1.01	115	164	NS
		OX10	1.10	1.01	119	164	NS
Filamin-B	O75369FLNBHUMAN	OX50	1.25	1.06	13	21	NS
GCN5-like protein 1	G95166GCN5L1HUMAN	OX10	0.837	0.702	8	16	PS
Glycyl-RNA synthetase	P41205G1RHUMAN	OX50	0.822	0.713	14	37	NS
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1	P11442G97CHUMAN	OX10	1.17	1.04	34	215	NS
Heat shock cognate 71 kDa protein	P69693HSC70HUMAN	OX5	1.28	1.03	7	41	NS
Hemoglobin subunit alpha	OX5	1.32	1.06	1.66	7	41	NS
Hemoglobin subunit epsilon	P02100HEBHUMAN	OX10	1.33	1.03	3	47	NS
		OX50	1.35	1.03	3	47	NS
Hepatoma-derived growth factor	P51838HDGFHUMAN	OX50	0.802	0.644	8	24	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	G99729HNR0A1HUMAN	OX50	0.802	0.676	15	110	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	P69651HNR0A1HUMAN	OX10	0.884	0.79	43	326	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	Q14103HNR0PDEHUMAN	OX50	0.791	0.707	43	326	NS
		OX10	0.857	0.738	22	139	NS
		OX50	0.85	0.736	22	139	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Q08939HNR0PUHUMAN	OX50	1.20	1.07	39	248	NS

PS: peptide signal  
VNC: voie non classique

\* : protéines possédant la séquence KDEEL



**Annexe 5:** Protéines identifiées par la méthode iTRAQ comme sur-exprimées au sein du sécrétome suite au traitement par l'oxaliplatine (72h) des cellules SH-SY5Y. Les protéines prédites sécrétées et sur-exprimées par OX1 sont encadrées.

Nom	Accession	Ratio iTRAQ moyenne	Ratio iTRAQ médiane	Intervalle crédible b. inférieure	Intervalle crédible b. supérieure	Nb peptides	Nb spectres	Sécrétion
Pentyl- <i>prolyl</i> cis-trans isomerase B	#P2354PPIRHUMAN	OX1	1.36	1.13	1.65	10	131	PS
Protein disulfide-isomerase A3	#P20101PDA3HUMAN	OX1	1.27	1.17	1.47	23	96	PS
Secretogranin-1	#P05605SCGHUMAN	OX1	1.14	1.14	1.20	32	449	PS
B-cell receptor-associated protein 31	#P21572BAP31HUMAN	OX1	1.57	1.56	2.19	3	5	PS
40S ribosomal protein S16	#P24985S16HUMAN	OX1	1.42	1.42	2.00	3	5	VNC
DnaJ homolog subfamily C member 8	#O75977DNJC8HUMAN	OX1	1.39	1.39	1.91	2	13	VNC
Endothelial differentiation-related factor 1	#O40689EDF1HUMAN	OX1	1.23	1.23	1.51	10	35	VNC
Enhancer of rudimentary homolog	#P04909ERHUMAN	OX1	1.37	1.37	1.81	4	17	VNC
Pentyl- <i>prolyl</i> cis-trans isomerase, mitochondrial	#P09405PPIRHUMAN	OX1	1.27	1.26	1.61	6	22	VNC
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	#P16086PEP1HUMAN	OX1	1.29	1.29	1.66	5	23	VNC
Srathmin	#P16948STAN1HUMAN	OX1	1.28	1.28	1.48	19	726	VNC
Thymosin beta-4	#P2328T3B4HUMAN	OX1	1.22	1.22	1.45	14	1574	VNC
Thymosin beta-4-like protein 3	#A8AV06TMSLHUMAN	OX1	1.58	1.57	2.09	5	18	VNC
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	#P09946UCH1HUMAN	OX1	1.20	1.20	1.37	26	946	VNC
40S ribosomal protein S30	#P23861RS30HUMAN	OX1	1.47	1.47	1.91	4	21	VNC
Calmodulin	#P2158CALMHUMAN	OX1	1.44	1.44	1.88	4	21	VNC
Clathrin light chain A	#P09496CLCAHUMAN	OX1	1.36	1.35	1.70	10	442	VNC
Ran-specific GTPase-activating protein	#P24367RAN3GHUMAN	OX1	1.38	1.39	1.79	5	22	VNC
Thymosin beta-10	#P2328T3B10HUMAN	OX1	1.40	1.40	1.78	5	9	VNC
Translationally-controlled tumor protein	#P16931TCTPHUMAN	OX1	3.78	3.78	4.94	7	45	VNC
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	#O2B2D11TFCRHUMAN	OX1	2.69	2.68	3.40	7	45	VNC
Actin, cytoplasmic 2; Actin, cytoplasmic 1	#P2354PPIRHUMAN	OX1	1.55	1.54	2.04	6	21	VNC
Adenosylhomocysteinase	#P2354PPIRHUMAN	OX1	1.44	1.44	1.86	5	20	VNC
Alpha-actinin-3	#P2354PPIRHUMAN	OX1	1.37	1.37	1.67	17	278	VNC
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	#P06733ENOBHUMAN	OX1	1.97	1.97	2.31	3	11	VNC
Cellular retinoic acid-binding protein 2	#P06756CABP2HUMAN	OX1	1.50	1.50	1.87	10	476	VNC
Cofilin	#P23538COFHUMAN	OX1	1.44	1.44	1.98	4	13	VNC
Histone H3 nucleosome-binding protein 1	#P23538COFHUMAN	OX1	1.41	1.41	1.87	19	156	VNC
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	#O75874IDHCYHUMAN	OX1	1.30	1.31	1.70	6	28	VNC
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	#P23538COFHUMAN	OX1	1.35	1.35	1.82	3	9	VNC
Nuclear autoantigen Sp-100	#P23538COFHUMAN	OX1	1.46	1.45	1.85	3	16	VNC
Protein disulfine-2	#P23538COFHUMAN	OX1	1.65	1.65	2.03	0	58	VNC
Proteasome RNA helicase B-AT1	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.37	1.37	1.88	9	192	VNC
Thioredoxin-dependent peroxidoreductase, mitochondrial	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.29	1.29	1.68	4	20	VNC
Transgelin-3	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.47	1.47	1.89	6	13	VNC
Tubulin beta-2B chain; Tubulin beta-2A chain; Tubulin beta chain	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.45	1.45	1.78	8	70	VNC
Tubulin beta-2C chain; Tubulin beta chain	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.77	1.76	2.58	2	7	VNC
14-3-3 protein epsilon	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.82	1.82	2.32	2	53	VNC
60S ribosomal protein L5	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	2.11	2.11	2.82	3	49	VNC
0-phosphoethanolamine dehydrogenase, decarboxylating	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	2.09	2.09	2.68	3	27	VNC
Alpha-actinin-1	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.54	1.54	1.99	3	16	VNC
Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.20	1.20	1.77	14	85	VNC
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.49	1.49	1.91	12	151	VNC
Bromodomain-containing protein 8	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Core histone macro-H2A.1	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Creininase B-type	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Cytosine tRNA synthetase, cytoplasmic	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Dihydropyrimidinase-related protein 1	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Dihydropyrimidinase-related protein 2	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Dihydropyrimidinase-related protein 3	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Dihydropyrimidinase-related protein 4	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Dihydropyrimidinase-related protein 5	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Drebrin	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Elongation factor 1-alpha 2	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Elongation factor 1-gamma	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Eukaryotic initiation factor 4A-II	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.43	1.43	1.84	1	5	VNC
Eukaryotic translation initiation factor 5A-2; Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like; Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-fascin	#P23119PR2CYHUMAN	OX1	1.27	1.27	1.55	6	148	VNC
		OX1	1.28	1.28	1.49	17	103	VNC

Annexe 5: suite

Nom	Accession	[Oxalplatine] Ratio ITRAQ moyenne	Ratio ITRAQ médiane	Intervalle crédible b. inférieure	b. supérieure	Nb peptides	Nb spectres	Secretion
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9P0406G3PFDHMAN	OX10	1.33	1.06	1.69	11	90	NS
Heat shock 70 kDa protein 1	9P08107HSP71HDMAN	OX10	1.25	1.03	1.53	17	177	NS
Heat shock 70 kDa protein 4	9P24957HSP74HDMAN	OX10	1.26	1.01	1.57	14	56	NS
Heat shock cognate 71 kDa protein	9P11147HSP71HDMAN	OX10	1.51	1.21	1.89	14	56	NS
Heat shock protein HSP 90-alpha	9P0900H90AHDMAN	OX10	1.27	1.08	1.48	35	537	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9P09657HNOA1HDMAN	OX10	1.80	1.45	2.26	13	71	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like protein ; Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9P023P51HNOA1L1HDMAN	OX10	1.18	1.03	1.35	40	558	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like protein ; Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9P09657HNOA1HDMAN	OX10	1.45	1.27	1.67	40	558	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like protein ; Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9P09657HNOA1HDMAN	OX10	1.31	1.03	1.68	4	60	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like protein ; Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9P09657HNOA1HDMAN	OX10	1.68	1.32	2.16	4	60	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	9P14109HNOA1HDMAN	OX10	1.41	1.14	1.73	17	127	NS
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	9P22626HNOA2HDMAN	OX10	1.39	1.19	1.63	35	910	NS
High mobility group protein B1	9P09429HMG1B1HDMAN	OX10	1.22	1.03	1.44	14	80	NS
High mobility group protein B2	9P26585HMG1B2HDMAN	OX10	1.30	1.07	1.6	12	35	NS
Histone H4	9P06309H4HDMAN	OX10	1.43	1.14	1.8	7	66	NS
Hsp90 co-chaperone Cdc37	9P01643CDC37HDMAN	OX10	1.35	1.00	1.84	3	9	NS
Inorganic pyrophosphatase	9P01181IPPYHDMAN	OX10	1.41	1.09	1.84	5	47	NS
Interferon enhancer-binding factor 2	9P13906ILF2HDMAN	OX10	1.67	1.26	2.19	4	17	NS
Lamin-B1	9P20700LMB1HDMAN	OX10	1.37	1.20	1.57	30	110	NS
Lupus L2 protein	9P05455L2HDMAN	OX10	1.5	1.20	1.88	9	24	NS
MARCKS-related protein	9P09006MRPHDMAN	OX10	1.41	1.08	1.86	4	14	NS
Microtubule-associated protein 1B	9P15114MAP1BHDMAN	OX10	1.51	1.14	1.98	4	14	NS
Microtubule-associated protein 1B	9P15114MAP1BHDMAN	OX10	1.24	1.08	1.42	31	103	NS
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	9P12423MARE1HDMAN	OX10	1.24	1.09	1.42	31	103	NS
Nucleoside diphosphate kinase B	9P14010NDKBHDMAN	OX10	1.40	1.14	1.72	10	49	NS
Nucleoside diphosphate kinase B ; Nucleoside diphosphate kinase A	9P22392NDKBHDMAN	OX10	1.27	1.07	1.50	14	257	NS
Nucleoside diphosphate kinase B ; Nucleoside diphosphate kinase A	9P22392NDKBHDMAN	OX10	1.56	1.29	1.88	6	72	NS
Nucleoside diphosphate kinase B ; Putative nucleoside diphosphate kinase	9P22392NDKBHDMAN	OX10	1.23	1.02	1.48	6	95	NS
Peptidylprolyl cis-trans isomerase A-like 4B	9P0973369P44BHDMAN	OX10	1.2	1.02	1.41	2	538	NS
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	9P06594FKBP1AHDMAN	OX10	1.30	1.04	1.62	6	36	NS
Phosphoglycerate kinase 1	9P06595PGK1HDMAN	OX10	1.18	1.01	1.38	19	189	NS
Phosphoglycerate mutase 1	9P18669PGAM1HDMAN	OX10	1.36	1.17	1.59	19	189	NS
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	9P09877PARP1HDMAN	OX10	1.44	1.22	1.69	17	84	NS
Profilin-1	9P07173PROF1HDMAN	OX10	1.54	1.31	1.81	18	80	NS
Protein mago nashi homolog 2 ; Protein mago nashi homolog	9P096647MAG2HDMAN	OX10	1.31	1.10	1.57	12	252	NS
Purative elongation factor 1-alpha-like 3 ; Elongation factor 1-alpha 1	9P05707EF1A3HDMAN	OX10	1.61	1.35	1.92	12	252	NS
Purative elongation factor 1-alpha-like 3 ; Elongation factor 1-alpha 2 ; Elongation factor 1-alpha 1	9P05707EF1A3HDMAN	OX10	1.37	1.37	1.37	2	6	NS
Purative elongation factor 1-alpha-like 3 ; Elongation factor 1-alpha 2 ; Elongation factor 1-alpha 1	9P05707EF1A3HDMAN	OX10	1.21	1.01	1.46	9	69	NS
Purative elongation factor 1-alpha-like 3 ; Elongation factor 1-alpha 2 ; Elongation factor 1-alpha 1	9P05707EF1A3HDMAN	OX10	1.59	1.28	1.98	3	37	NS
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	9P14618PKTMHDMAN	OX10	1.36	1.16	1.60	17	111	NS
Rab GDP dissociation inhibitor beta	9P09395GDI2HDMAN	OX10	1.60	1.34	1.92	11	62	NS
Retinol-binding protein 1	9P09445RBP1HDMAN	OX10	1.64	1.34	1.99	10	117	NS
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	9P25265GDIR1HDMAN	OX10	1.32	1.06	1.64	8	93	NS
RNA-binding protein FUS	9P35467FUSHDMAN	OX10	1.35	1.10	1.65	10	41	NS
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	9P07KZF45ND1HDMAN	OX10	1.36	1.03	1.81	5	6	NS
Stress-70 protein, mitochondrial	9P38646GRP7HDMAN	OX10	1.38	1.10	1.73	7	143	NS
Stress-induced-phosphoprotein 1	9P31948STP1HDMAN	OX10	1.56	1.32	1.84	17	100	NS
SUMO-activating enzyme subunit 2	9P09527SAE2HDMAN	OX10	1.82	1.81	2.48	3	6	NS
T-complex protein 1 subunit beta	9P78371TCPBHDMAN	OX10	1.7	1.26	2.32	4	13	NS
T-complex protein 1 subunit epsilon	9P48643TCPEHDMAN	OX10	1.46	1.04	2.04	3	18	NS
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	9P55073TERAHDMAN	OX10	1.58	1.27	1.96	11	36	NS
Troponin phosphatase	9P06174TFPHDMAN	OX10	1.25	1.08	1.43	28	2023	NS
Troponin alpha-4 chain	9P06956TPM4HDMAN	OX10	1.28	1.05	1.57	12	51	NS
Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	9P23381SYWCHDMAN	OX10	1.55	1.16	1.99	3	25	NS
Tubulin alpha-1A chain	9P07U36TBA1AHDMAN	OX10	1.52	1.16	1.99	4	19	NS
Tubulin beta chain	9P07437TBBHDMAN	OX10	1.58	1.58	1.58	7	56	NS
Tubulin beta-3 chain	9P01509TBB3HDMAN	OX10	1.48	1.48	1.48	3	18	NS
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	9P08621U1UHDMAN	OX10	1.46	1.07	2.06	4	22	NS
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	9P45974UBP5HDMAN	OX10	1.35	1.03	1.78	3	18	NS

PS: peptide signal  
VNC: voie non classique

**Annexe 6:** Protéines identifiées par la méthode iTRAQ comme sous-exprimées au sein du sécrétome suite au traitement par l'oxaliplatine (72h) des cellules SH-SY5Y.

Nom	Accession	[Oxaliplatine] Ratio iTRAQ moyenne	Ratio iTRAQ médiane	Intervalle crédible b. inférieure	b. supérieure	Nb peptides	Nb spectres	Sécrétion
72 kDa type IV collagenase	#P08353 MANP HUMAN	0.61	0.578	0.539	0.692	30	373	PS
ADAM 10	#Q14672 ADA10 HUMAN	0.577	0.578	0.44	0.755	4	19	PS
ADAM 22	#P08353 AD22 HUMAN	0.506	0.506	0.403	0.633	7	37	PS
Amin	#Q00468 ACR HUMAN	0.775	0.775	0.654	0.921	14	78	PS
Amyloid beta A4 protein	#P05097 A4 HUMAN	0.72	0.72	0.615	0.846	22	299	PS
Amyloid-like protein 1	#P51683 AP1 HUMAN	0.626	0.626	0.537	0.743	13	170	PS
Cadherin-11	#P55387 CAD11 HUMAN	0.714	0.714	0.570	0.88	30	318	PS
Cadherin-2	#P19022 CAD2 HUMAN	0.495	0.495	0.431	0.571	30	300	PS
Calretinin-1	#Q04853 CTN1 HUMAN	0.610	0.610	0.538	0.713	32	60	PS
Calretinin-2	#Q04854 CTN2 HUMAN	0.737	0.738	0.593	0.917	10	109	PS
Calretinin-3	#Q04855 CTN3 HUMAN	0.771	0.771	0.626	0.959	11	109	PS
Calretinin-4	#Q04856 CTN4 HUMAN	0.733	0.733	0.582	0.924	33	434	PS
CD166 antigen	#Q13140 CD166 HUMAN	0.749	0.749	0.658	0.838	35	33	PS
Cell adhesion molecule 1	#Q8RXY7 CADM1 HUMAN	0.636	0.637	0.481	0.844	4	17	PS
Cell adhesion molecule 4	#Q8RZ6C CADM4 HUMAN	0.622	0.622	0.457	0.834	4	19	PS
Chromogranin-A	#P10645 CMGA HUMAN	0.775	0.775	0.666	0.898	28	320	PS
Collagen alpha-1(III) chain	#P03461 CO3A1 HUMAN	0.497	0.497	0.409	0.577	38	320	PS
Collagen alpha-1(VI) chain	OX10	0.524	0.523	0.458	0.598	36	268	PS
Collagen alpha-2(IV) chain	#P11098 CO4A2 HUMAN	0.655	0.655	0.51	0.838	7	37	PS
Collagen alpha-2(XV) chain	#P08372 COX2 HUMAN	0.686	0.686	0.486	0.97	3	5	PS
Complement component C7	#P10481 C7 HUMAN	0.666	0.666	0.486	0.97	16	141	PS
Contractin-2	#P03346 CTC2 HUMAN	0.699	0.697	0.533	0.798	14	93	PS
Contractin-C	#P01843 CTC HUMAN	0.617	0.616	0.527	0.725	14	97	PS
Dickkopf-related protein 2	#Q08184 DKK2 HUMAN	0.73	0.73	0.554	0.96	3	13	PS
Dickkopf-related protein 3	#Q08185 DKK3 HUMAN	0.65	0.65	0.476	0.884	2	18	PS
Dopamine beta-hydroxylase	#P08172 DOPO HUMAN	0.784	0.783	0.666	0.924	26	346	PS
Dystroglycan	OX10	0.493	0.493	0.383	0.633	20	28	PS
EMILIN-1	#Q14118 EM1 HUMAN	0.61	0.609	0.483	0.776	12	44	PS
Ephrin-A1	#P08176 EFNA1 HUMAN	0.702	0.702	0.602	0.848	4	3	PS
Ephrin-A5	OX10	0.542	0.542	0.462	0.648	12	4	PS
Ephrin-B2	#P53360 EFNB2 HUMAN	0.715	0.715	0.525	0.976	3	3	PS
Ephrin-B3	#P53370 EFNB3 HUMAN	0.717	0.717	0.546	0.936	4	17	PS
Ephruncin	OX10	0.684	0.685	0.524	0.916	3	15	PS
Follistatin-related protein 1	#P07319 FRL1 HUMAN	0.681	0.681	0.538	0.859	5	22	PS
Galectin-3-binding protein	#P08144 FSTL1 HUMAN	0.694	0.694	0.524	0.880	5	57	PS
Glypican-1	OX10	0.606	0.606	0.470	0.77	17	120	PS
Glypican-2	#P08380 GPC2 HUMAN	0.572	0.572	0.466	0.702	5	22	PS
Glypican-3	#P03072 GPC3 HUMAN	0.66	0.66	0.480	0.89	8	38	PS
Glucosylaminidase-15	#P08186 GL15 HUMAN	0.533	0.533	0.304	0.753	8	35	PS
Insulin-like growth factor-binding protein 2	#Q08187 IGFBP2 HUMAN	0.685	0.685	0.448	0.933	17	439	PS
Insulin-like growth factor-binding protein 4	#P13591 IGFBP4 HUMAN	0.549	0.549	0.467	0.648	5	72	PS
Insulin-like growth factor-binding protein-like 1	#P22892 IGFBP5 HUMAN	0.655	0.655	0.489	0.857	6	223	PS
Lanophilin-1	OX10	0.61	0.61	0.487	0.771	4	19	PS
Lumican	#P09491 LUM HUMAN	0.754	0.754	0.506	0.998	3	14	PS
Matrix metalloproteinase-15	#P21884 MT15 HUMAN	0.74	0.74	0.549	0.993	3	40	PS
Metalloproteinase inhibitor 2	#P21311 MI2 HUMAN	0.776	0.776	0.603	0.996	6	40	PS
Microbivarin-associated protein 2	#P16053 MAP2 HUMAN	0.536	0.537	0.462	0.624	21	282	PS
Neural cell adhesion molecule 1	#P15500 NCAM1 HUMAN	0.676	0.677	0.505	0.802	4	8	PS
Neural cell adhesion molecule L1	OX10	0.729	0.73	0.599	0.885	16	287	PS
Nesxun-1-alpha	#P23004 NCAM HUMAN	0.567	0.567	0.476	0.677	21	178	PS
Neuroendocrine protein 7B2	#P09119 NEP7 HUMAN	0.71	0.712	0.503	0.995	3	5	PS
Neuronal cell adhesion molecule	#P05468 NCA HUMAN	0.687	0.687	0.501	0.966	3	13	PS
Neurotrophin Y	#P01305 NPT HUMAN	0.687	0.687	0.483	0.806	28	228	PS
Nucleobindin-1	#P01340 NBD1 HUMAN	0.855	0.855	0.493	0.989	7	227	PS
Nucleobindin-2	#P02318 NBD2 HUMAN	0.746	0.746	0.611	0.911	14	132	PS
Nucleobindin-3	#P02319 NBD3 HUMAN	0.763	0.763	0.6	0.97	6	17	PS
Nucleobindin-4	#P02320 NBD4 HUMAN	0.65	0.65	0.487	0.808	4	49	PS
Nucleobindin-5	#P02321 NBD5 HUMAN	0.71	0.711	0.538	0.956	3	19	PS
Platelet-derived growth factor	#P06292 PDGF HUMAN	0.744	0.744	0.567	0.974	3	25	PS
Proactivator polyprotein	#P09658 PCP HUMAN	0.749	0.748	0.585	0.963	20	20	PS
Procollagen C-endopeptidase XI	#P01511 PCOX HUMAN	0.533	0.533	0.469	0.608	29	280	PS
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	#P09472 PCE HUMAN	0.701	0.702	0.577	0.86	2	123	PS
ProSAS	#P08114 SAS HUMAN	0.72	0.721	0.534	0.966	9	6	PS
Protin shisa-5	#P07949 RETH HUMAN	0.708	0.708	0.538	0.938	3	48	PS
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret	OX10	0.708	0.708	0.623	0.804	32	449	PS
Secretogranin-1	#P05060 SG1 HUMAN	0.66	0.66	0.555	0.786	14	132	PS
Secretogranin-2	#P13121 SG2 HUMAN	0.659	0.659	0.552	0.785	15	61	PS
Secretogranin-3	#Q08202 SG3 HUMAN	0.496	0.496	0.394	0.619	7	58	PS
Seizure 6-like protein 2	#P06030 S6L2 HUMAN	0.541	0.541	0.418	0.694	5	24	PS
Seizure 6-like protein	#P09374 S6L1 HUMAN	0.671	0.671	0.497	0.906	3	11	PS
Senun albumin	#P02768 SALB HUMAN	0.773	0.772	0.65	0.915	14	141	PS
SPARC	OX10	0.452	0.452	0.358	0.538	21	84	PS
Tenascin	#P24821 TEN HUMAN	0.754	0.753	0.644	0.889	21	84	PS
	OX10	0.409	0.409	0.348	0.481	21	84	PS

Annexe 6: suite

Nom	Accession	[Oxalplatine] Ratio ITRAQ moyenne	Ratio ITRAQ mediane	Intervalle crédible		Nb peptides	Nb spectres	Sécrétion
				b. inférieure	b. supérieure			
Testiculin-1	#Q08629 TCNH3HUMAN	OX10	0.401	0.401	0.309	5	68	PS
Transmembrane protein 132A	#Q04951 T132AHUMAN	OX10	0.536	0.536	0.44	8	42	PS
Tyrosine-protein kinase-like 7	#Q13308 PTK7HUMAN	OX10	0.646	0.645	0.513	9	36	PS
Vascular endothelial growth factor A	#P15692 VEGF-AHUMAN	OX10	0.683	0.684	0.506	2	30	PS
Vesicular core protein	#P16111 CSPG2HUMAN	OX10	0.573	0.573	0.438	6	43	PS
VPS10 domain-containing receptor SorCS1	#Q8W711 SORCS1HUMAN	OX10	0.66	0.66	0.534	14	86	PS
Acyl carrier protein, mitochondrial	#Q14861 ACPFHUMAN	OX10	0.702	0.702	0.534	4	16	VNC
Acyl-CoA-binding protein	#P07108 ACBFHUMAN	OX10	0.788	0.788	0.661	11	113	VNC
Beta-2-microglobulin	#P01692 B2MGHUMAN	OX10	0.657	0.657	0.501	6	24	VNC
Histone H2A.1; Histone H2A type 1-J; Histone H2A type 1-H; Histone H2A type 2-A; Histone H2A type 2-B; Histone H2A type 1-D	#Q9BTU1 H2A1HUMAN...	OX1	0.777	0.778	0.628	4	290	VNC
Integral membrane protein_2B	#Q9Y728 ITM2B2HUMAN	OX10	0.711	0.711	0.514	2	10	VNC
Purine nucleoside phosphorylase	#P04911 PNPFHUMAN	OX1	0.74	0.742	0.606	10	36	VNC
Small ubiquitin-related modifier 2	#P61966 SUMO2HUMAN	OX10	0.673	0.674	0.51	10	36	VNC
Tenascin-R	#Q2752 TENRHUMAN	OX10	0.776	0.776	0.627	4	59	VNC
Transferrin receptor protein 1	#P02786 TFRHUMAN	OX10	0.519	0.519	0.426	13	66	VNC
Tropomyosin alpha-1 chain	#P04951 TPM1HUMAN	OX10	0.661	0.66	0.497	6	22	VNC
Ubiquitin	#P62988 UBQHUMAN	OX10	0.721	0.721	0.53	9	9	VNC
60S ribosomal protein L13	#P26751 RL13HUMAN	OX10	0.777	0.777	0.639	9	246	VNC
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	#Q9T8B4 TMS1HUMAN	OX10	0.723	0.723	0.526	2	15	NS
Beta-enolase	#P13929 ENOBHUMAN	OX1	0.605	0.606	0.482	7	45	NS
Histone H4	#P23805 H4HUMAN	OX1	0.76	0.76	0.579	5	33	NS
Interleukin enhancer-binding factor 3	#Q12906 ILF3HUMAN	OX1	0.744	0.744	0.587	7	66	NS
Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	#P42167 LAP2BHUMAN	OX10	0.796	0.797	0.654	12	30	NS
Myosin-10	#P53580 MY10HUMAN	OX10	0.821	0.82	0.682	10	58	NS
Proteasome subunit alpha type-6	#P60900 PSA6HUMAN	OX10	0.702	0.703	0.535	4	16	NS
Splicing factor 3B subunit 1	#Q86981 SF3B1HUMAN	OX1	0.766	0.766	0.614	7	30	NS
THO complex subunit 4	#Q75533 SF3B1HUMAN	OX10	0.717	0.718	0.594	12	74	NS
Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A	#Q9U2Z6 THSP7AHUMAN	OX10	0.637	0.637	0.497	6	72	NS
Triosephosphate isomerase	#P60174 TPSIHUMAN	OX10	0.574	0.574	0.457	10	29	NS
Tubulin alpha-1A chain ; Tubulin alpha-1B chain	#Q1U267 TBA1AHUMAN...	OX1	0.865	0.865	0.753	28	2023	NS
Tubulin beta chain	#P07437 TBB3HUMAN	OX1	0.486	0.487	0.335	3	7	NS
Tubulin-specific chaperone A	#P075347 TBCAHUMAN	OX10	0.709	0.708	0.577	7	56	NS
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	#P98160 PFBMHUMAN	OX10	0.751	0.749	0.575	5	66	NS
		OX10	0.654	0.654	0.455	2	11	non déterminé

PS: peptide signal  
VNC: voie non classique

**Annexe 7:** Protéines de petite taille ( $\leq 30$  kDa) régulées au sein du sécrétome suite au traitement par 1  $\mu$ M d'oxaliplatine (72h) des cellules SH-SY5Y, identifiées à l'aide d'1 unique peptide dans les 2 réplicats biologiques par la méthode iTRAQ. Un ratio iTRAQ (OX1/CTRL) et un intervalle de confiance ont été déterminés pour chaque peptide.

Nom	Accession	[Oxaliplatine] moyenne	Ratio iTRAQ	Intervalle crédible b. inférieure	b. supérieure	Nb spectres	Sécrétion	N° dans la base PPP
Histone H2B type 1-L	†P09880H2B1LHUMAN	OX1	0.6	0.46	0.78	37	NS	
Peroxisomal biogenesis factor 19 (Isoform 5)	†P40833PEX19HUMAN	OX1	0.62	0.43	0.89	2	NS	
Coiled-coil domain-containing protein 58	†Q4VC31CCD58HUMAN	OX1	0.69	0.58	0.83	13	VNC	
Small ubiquitin-related modifier 4	†Q6EEV6SUM04HUMAN	OX1	0.73	0.56	0.94	56	VNC	
Putative small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E-like protein 1	†Q3YV74RUE1LHUMAN	OX1	0.74	0.66	0.83	34	VNC	
Inositol monophosphatase	†P3218LMPA1HUMAN	OX1	0.79	0.65	0.95	13	VNC	
FK506-binding protein 7 (Isoform 2)	†Q9Y7680FKBP7HUMAN	OX1	0.81	0.66	1.00	8	PS	
Chloride intracellular channel protein 1	†Q00299CLIC1HUMAN	OX1	0.83	0.68	1.00	11	NS	
Histone H1x	†Q9252H1X1HUMAN	OX1	0.83	0.69	0.99	14	NS	
Protein FAM107B	†Q9H98F107B1HUMAN	OX1	1.4	1.1	1.8	6	VNC	
Protein FAM136A	†Q96C01F136A1HUMAN	OX1	1.4	1.0	1.8	4	VNC	
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (Isoform 2)	†Q95292VAPB1HUMAN	OX1	1.5	1.3	1.9	10	VNC	
EF-hand domain-containing protein D2	†Q96C19EFHD1HUMAN	OX1	1.6	1.3	1.8	18	NS	
Non-histone chromosomal protein HMG-14	†P03114HMG14HUMAN	OX1	2.1	1.8	2.5	14	NS	
Neudesin	†Q9UMX3NEN1HUMAN	OX1	2.8	2.1	3.8	4	PS	1336

PS: peptide signal  
VNC: voie non classique