

Génomique et protéomique : leur intérêt en clinique

Genomic and proteomic: clinical interest

Mots-clés : Génomique, Protéomique, Technologie à haut débit, Signature moléculaire de la tumeur.

Keywords: *Genomic, Proteomic, High flow technology, Molecular signature of the tumour.*

T. Maudelonde, N. Boulle, A. Mange, J.-M. Rey, J. Solassol⁽¹⁾

Jusqu'à une période récente, les traitements du cancer du sein ont évolué sur un mode empirique, se fondant principalement sur les pourcentages de réponse de catégories de patients essentiellement définis par des paramètres cliniques (envahissement ganglionnaire, taille de la tumeur, grade histologique...). Cette méthode est loin d'être satisfaisante, car fondée sur le principe que tous les cancers d'un groupe ainsi constitué doivent répondre de la même façon. Or, la cancérogenèse est un processus qui comporte de multiples étapes pouvant être différentes, même au sein d'un même tissu. C'est cette hétérogénéité biologique non maîtrisée par les paramètres cliniques qui limite l'efficacité d'un traitement identique pour les patientes d'un groupe présentant la même symptomatologie clinique. L'importance d'une connaissance de la biologie des cancers a été mise en exergue par l'utilisation du tamoxifène dans les tumeurs ayant des récepteurs aux estrogènes et très largement confirmée par l'efficacité des anticorps neutralisants anti-HER2 (trastuzumab) [1] dans les cancers du sein hyperexprimant HER2. L'ère des traitements systématiques de patientes correspondant à de grands types cliniques est donc en train de s'achever pour laisser la place à des traitements adaptés au phénotype biologique de la tumeur. Les nouvelles technologies ont considérablement fait évoluer nos connaissances de la cancérogenèse et, à l'heure actuelle, des méthodes d'analyse à haut débit se développent qui devraient permettre de bien caractériser les familles biologiques de cancer du sein tant sur le plan du pronostic que sur celui du traitement et du dépistage.

1. Laboratoire de biologie cellulaire, CHU de Montpellier, INSERM U540.

Problématique du cancer du sein

La fréquence des cancers du sein ne cesse de croître et plus d'une femme sur dix aura un cancer du sein en France. L'attitude la plus efficace pour diminuer la mortalité est de prévenir l'évolution vers une forme invasive ou bien de dépister précocement le cancer. L'avenir est aussi au phénotypage biologique des cancers qui, du fait de l'instabilité génétique, va avoir sa propre évolution, nécessitant un traitement ciblé spécifique. C'est pour ces raisons que les efforts actuels des biologistes se portent sur le développement de technologies à haut débit qui permettent de réunir un maximum d'informations biologiques permettant une caractérisation très spécifique pour un coût limité.

Limitations importantes des méthodes classiques d'identification d'un marqueur

En général, elles concernaient des études rétrospectives faites à partir d'échantillons congelés dans des conditions plus ou moins bien contrôlées avec un seul marqueur candidat. Leur spécificité et leur sensibilité sont insuffisantes et il n'a pu être envisagé des tests sérologiques de dépistage précoce, à l'exception de la PSA pour le cancer de la prostate. De même, jusqu'à une époque récente, ces tests biologiques ont très peu été pris en compte dans l'évaluation du pronostic et des indications thérapeutiques des tumeurs solides, et plus particulièrement des cancers du sein [2, 3]. Les récepteurs stéroïdiens, un marqueur de prolifération tel que le PCNA ou le Ki 67 sont souvent demandés, de même qu'un marqueur de métastases (uPA) ou d'agressivité comme HER2. Ces méthodes ont cependant permis de mettre en évidence l'intérêt de la biologie dans le pronostic et dans les indications thérapeutiques.

Les différentes méthodes d'analyse de l'expression des gènes

Elles permettent d'évaluer l'expression de plusieurs gènes à la fois. Le génome humain possède 30 000 à 40 000 gènes. L'expression de ces divers gènes peut donner naissance à plus d'un million de protéines. Un gène peut donc être à l'origine de plusieurs protéines. Le choix de la synthèse d'une protéine donnée va donc dépendre non seulement de la transcription du gène en ARN mais aussi d'autres mécanismes (*figure*) dont les régulations sont complexes et vont varier d'un tissu à l'autre. On appelle "génom" l'ADN total, "transcriptome", l'ensemble des ARN, et "protéome", les protéines synthétisées dans la cellule. Au cours de la cancérogenèse se produisent des anomalies de l'expression des gènes qui vont modifier ces trois grands groupes de molécules. L'étude du génome, ou génomique structurale (recherche de mutations, de délétions...), devrait donc montrer des anomalies, tout comme la génomique fonctionnelle (ARN) et la protéomique.

Les puces à ADN

Elles exploitent une propriété des molécules d'ADN et d'ARN qui est l'hybridation par complémentarité des bases azotées des nucléotides que constituent les acides nucléiques (*figure*). Une séquence d'ADN, synthétisée *in vitro* et fixée sur un support, devient ainsi une sonde capable de reconnaître sa séquence complémentaire dans un milieu contenant des ARN ou de l'ADN. On est capable de fixer sur une surface, parfois inférieure à 1 cm², plusieurs milliers de sondes permettant ainsi d'apprécier le transcriptome d'un type cellulaire [4]. Deux technologies existent : la société Affymetrix synthétise des sondes de petite taille (20-25 nucléotides), *in situ* sur le support, lesquelles concernent plusieurs milliers de gènes. D'autres synthétisent des sondes qui sont souvent plus longues, puis les fixent sur le support pour former des puces dites "à façon" car les gènes recherchés sont choisis pour une étude donnée. La cible à détecter est auparavant rendue fluorescente : lorsqu'elle est retenue par sa sonde complémentaire, elle émet ainsi un signal fluorescent facilement visible. Cette intensité va varier en fonction du nombre de molécules d'ARN correspondant présentes dans le milieu à analyser. Puisqu'il s'agit de plusieurs milliers de gènes, les variations d'expression mises en évidence par les puces à ADN vont générer un grand nombre d'informations ne pouvant être interprétées sans l'aide de la bio-informatique, qui permet de les traiter de façon globale.

Grâce à cette méthodologie, certaines équipes ont mis en évidence des familles de gènes dont l'expression est altérée durant la cancérogenèse mammaire. Malheureusement, ces études sont réalisées sur un nombre d'échantillons encore insuffisant pour maîtriser la variabilité biologique [5].

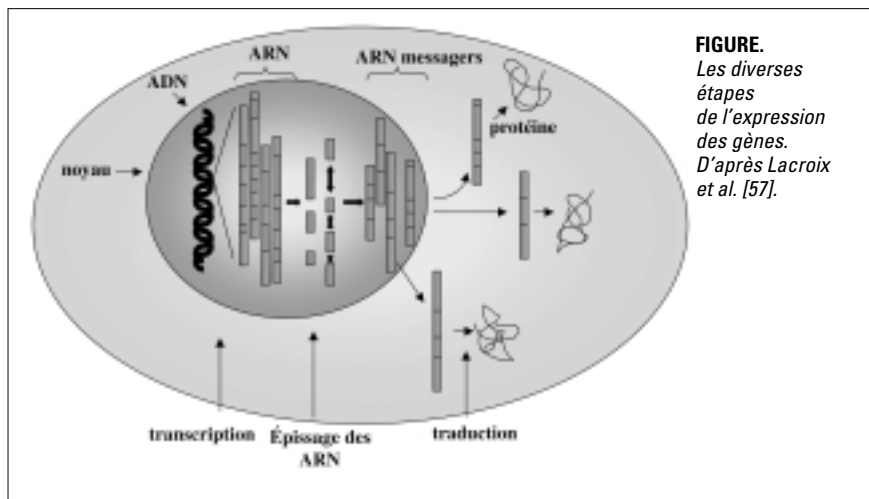


FIGURE.
Les diverses étapes de l'expression des gènes. D'après Lacroix et al. [57].

La génomique structurale dans les cancers du sein

Elle permet de détecter les anomalies chromosomiques induites par la cancérogenèse telles que les mutations, les délétions, les duplications de gènes, les translocations et l'amplification de gènes. Plusieurs technologies englobées sous le terme de "cytogénétique" se sont développées pour rechercher ces aberrations chromosomiques: caryotypage, SKY (*Spectral Cytotyping*), FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*), la recherche d'une perte d'hétérozygotie ou d'un déséquilibre allélique (LOH). Récemment, une nouvelle technique d'analyse des chromosomes permettant d'établir une cartographie des modifications du nombre de copies s'est développée. Il s'agit de l'hybridation génomique comparative (CGH), rapportée pour la première fois en 1992 [6] et qui s'est largement répandue ces dernières années. La méthode classique analysant les chromosomes lors de la métaphase présentait le désavantage de ne pas pouvoir détecter les mosaïques, les translocations chromosomiques équilibrées ni les ploïdies [7]. Pour pallier ces insuffisances, une technique de CGH sur micropuces a été mise au point qui utilise des fragments d'ADN cloné (100-200 kb) de localisation connue plutôt que les chromosomes métaphasiques [8].

La génomique fonctionnelle dans les cancers du sein

Classification pronostique

Les quelques études sur les cancers du sein permettent déjà une classification biologique de certains cancers [9-13]. Dans une étude englobant plus de 85 % de cancers canauxaires infiltrants du sein, au moins cinq sous-groupes distincts ont été retrouvés par analyse de l'expression génique [9, 14]. Une classification hiérarchique met en évidence les récepteurs aux estrogènes comme étant le facteur informatif le plus important. Les cancers du sein se divisent en RE+ et en RE (-). On retrouve deux sous-groupes dans le groupe des RE+ et trois dans le groupe des RE (-). L'un de ces sous-groupes contient les échantillons de seins normaux et les cancers du sein présentant des caractéristiques des cellules épithéliales lumorales (en majorité RE+), l'autre, les tumeurs hyperexprimant HER2, et le dernier, les cancers présentant des caractéristiques de cellules épithéliales basales mammaires (cellule myoépithéliale). Ces résultats suggèrent fortement que les cancers canauxaires dérivent de deux types distincts de cellule: les cellules basales et les cellules lumorales. Ces trois classes ont des caractéristiques biologiques et pronostiques très différentes. Plusieurs travaux d'une même équipe [11, 12], testant 25 000 gènes, ont trouvé une classification biologique pronostique des cancers du sein T1, T2 sans envahissement ganglionnaire, fondée sur 70 gènes. Cette classification se révélait plus fiable que les critères clinico-pathologiques classiques dans la prédiction de récurrence et de celle de la survie globale [11]. Cette étude a été renforcée par les résultats du Transbig [15] et une autre équipe a présenté récemment un autre profil d'expression génique pronostique utilisant une plate-forme Affymetrix [16]. Les formes familiales de cancers du sein ayant une mutation de BRCA1 présentent un profil d'expression génique particulier [12, 17, 18].

Classification de la réponse au traitement

Quelques études sur des nombres limités de malades ont fait état de profil génique spécifique d'une sensibilité aux chimiothérapies néoadjuvantes. Ainsi, un groupe de 92 gènes serait capable de prédire la réponse au docétaxel [19], et un groupe de 74 gènes, la réponse au paclitaxel [20].

La présence de RE prédit la réponse au tamoxifène. Ces cancers présentent un profil d'expression génique particulier [9, 12, 14, 21, 22]. Une autre approche a été adoptée par le *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) [23] qui, se fondant sur les données de la littérature, a établi un score de récurrence des cancers du sein ayant eu un traitement adjuvant par le tamoxifène à partir de 16 gènes évalués par RT-PCR quantitative. Des données préliminaires semblent démontrer que ce score serait également intéressant dans les traitements adjuvants par chimiothérapie [24].

Les méthodes d'analyse protéomique

L'étude de l'ensemble des protéines contenues dans la cellule tumorale est encore plus vaste et plus complexe que le génome. L'analyse de leur nature, de leur dynamique et de leurs interactions (cellule tumorale versus cellule stromale) est donc essentielle pour une meilleure compréhension des mécanismes d'initiation, de progression tumorale et de dissémination métastatique. Le protéome, terme proposé en 1995 par M.R. Wilkins, désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe, à un instant donné et dans un environnement donné. Son analyse permet une description dynamique de la régulation de l'expression des gènes. Elle associe l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles, l'identification des protéines constituant un complexe protéique (interaction protéine-protéine), la recherche et l'identification de protéines impliquées dans les voies de signalisation.

L'approche protéomique est fondée sur le couplage de trois technologies de pointe :

- l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE), qui permet de séparer plusieurs milliers de protéines d'un même échantillon ;
- la spectrométrie de masse (MS), qui permet d'identifier ces protéines et met en évidence leurs modifications post-traductionnelles ;
- la bioinformatique, qui permet la quantification du niveau des protéines et la constitution de bases de données.

Méthode classique de protéomique

Principe

La méthode classique d'électrophorèse bidimensionnelle associée à la spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight*) repose sur la séparation des protéines en fonction de deux caractéristiques biochimiques : le point isoélectrique (PI) et la masse moléculaire. Une fois la 2-DE réalisée, les protéines sont

révélées selon différentes méthodes et les images captées par le *scanning* des gels sont traitées par des logiciels d'analyse d'images dédiés à la protéomique. Ces logiciels permettent l'acquisition des données, la diminution du bruit de fond, l'élimination des défauts sur les gels, le dénombrement des taches, leur comparaison en analyse différentielle, leur quantification par les mesures d'intensité et de volume. Les taches d'intérêt pouvant contenir une ou plusieurs protéines sont découpées des gels et sont traitées individuellement selon des protocoles précis d'hydrolyse trypsique: déshydratation du gel, extraction des peptides, dessalage de l'hydrolysate peptidique déposé sur plaque spéciale et séché. L'identification des protéines se fait par spectrométrie de masse de type MALDI-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Mass Spectrometry*) ou ESI-MS (*Electro-spray ionisation*) couplée à la chromatographie liquide (LC). L'automatisation de toutes ces étapes, de la 2-DE à l'analyse par MALDI-MS, correspond à ce que l'on appelle la "protéomique à haut débit" menant à identifier plusieurs centaines de protéines dans un même échantillon.

Application de la protéomique aux cancers du sein

La plupart des études sur le sein avaient pour but d'identifier les protéines qui sont différemment exprimées dans le tissu normal et dans le tissu cancéreux. Pour parvenir à ce résultat, la microdissection par capture laser a été utilisée. Elle permet d'isoler les cellules tumorales du stroma environnant et du tissu normal [25] et de caractériser le tissu cancéreux, sans contamination par le tissu voisin, à l'aide des diverses techniques de protéomique [25, 26]. Trente mille (30 000) à 50 000 cellules semblent suffisantes pour obtenir des données exploitables. Quelques études sur un petit nombre de cancers du sein invasifs ont été publiées et un certain nombre de différences dans l'expression protéique ont été trouvées, bien que 70 à 85 % de ces protéines ne soient pas significativement différentes entre le tissu tumoral et le tissu cancéreux [27, 28]. Un autre travail, portant sur une petite quantité de carcinomes canaux in situ, objective 57 protéines différemment exprimées du sein normal [26]. Beaucoup de ces protéines n'avaient pas encore été associées aux cancers du sein, démontrant le grand intérêt de développer cette technologie dans la problématique des cancers du sein.

Méthode de "puces" à protéines

Principe

Une nouvelle méthode appelée SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation-Time of Flight*) est apparue. Développée par Ciphergen biosystems, cette plateforme protéomique associe le principe de "puce" à la spectrométrie de masse. La séparation, la détection et l'analyse des protéines se font directement à partir de l'échantillon biologique avec une sensibilité de l'ordre du femtomole. En pratique, quelques microgrammes de protéines issues d'échantillons variés (liquides biologiques, extraits cellulaires ou tissulaires) sont directement adsorbés sur une surface de 2 mm² (spot) présentant des propriétés chromatographiques variées. En fonction de la surface chromatographique, le mélange

protéique subit un fractionnement qui dépend de la propriété chimique (anionique, cationique, hydrophobe, hydrophile ou d'affinité aux métaux) ou biologique (liaison à un anticorps, un peptide, un récepteur, un ligand ou un acide nucléique). Après une série d'étapes de lavage, la puce à protéine est introduite dans un spectromètre de masse. Sous l'action du rayonnement laser, les protéines liées à la puce sont désorbées/ionisées et analysées en termes de masse sur charge (m/z) d'après leur temps de vol pour atteindre le détecteur. Les signaux traités par des moyens informatiques sont traduits en spectre d'abondance relative versus la masse moléculaire des espèces détectées. Au final, l'ensemble des peptides présents dans un échantillon se présente sous la forme d'un profil protéique. Ils sont ensuite normalisés et calibrés pour limiter les biais liés à l'opérateur, à la surface chromatique ou à l'instrumentation elle-même.

Ce système est particulièrement intéressant en analyse différentielle de type patient / témoin pour mettre en évidence des profils d'expression spécifiques. L'analyse statistique de l'ensemble de ces données est une des étapes les plus importantes de l'étude protéomique. Si l'on traite suffisamment d'échantillons en parallèle, le logiciel permettant la superposition de profils pourra établir une statistique en fonction d'une multitude d'algorithmes informatiques basés sur des analyses statistiquement multivariées (analyse discriminante, classification hiérarchique...). Ces algorithmes permettent d'analyser des données complexes et de trouver la meilleure combinaison de marqueurs capables de discriminer chacun des groupes de patients par rapport aux témoins. Par la suite, l'identification de marqueurs potentiels nécessite des étapes de purification supplémentaires par des méthodes électrophorétiques ou chromatographiques classiques afin de caractériser précisément des protéines d'intérêt.

Cette dernière méthode d'analyse protéique par SELDI-TOF est une approche d'accès assez facile sur le plan technique. Cette méthode de microanalyse, réalisée à partir de faibles quantités protéiques de l'ordre du microgramme, a une capacité d'analyse à haut débit des échantillons, ce qui facilite son application clinique.

Sérum des cancers et plateforme SELDI-TOF

Les premiers travaux concernant cette technologie ont été publiés en 2002 par Petricoin et al. Utilisant les puces à protéines, ils ont analysé le sérum de malades atteints de cancer de l'ovaire et de cancer de la prostate [29, 30]. Ils rapportaient qu'un profil protéique spécifique sans identification de marqueur d'intérêt était capable de diagnostiquer ce cancer au stade infraclinique avec une spécificité de 95 %, une sensibilité de 100 % et une valeur prédictive positive de 94 %, et de différencier le cancer de la prostate de l'hyperplasie bénigne [30]. D'autres exemples pouvaient être donnés dans le cancer colorectal [31], le cancer du sein [32-35], l'hépatocarcinome [36], le mélanome [37] et le cancer du pancréas [38].

Cependant, plusieurs groupes de recherche utilisant les mêmes approches expérimentales et travaillant sur la même pathologie n'ont pas mis en évidence les mêmes pics

permettant de discriminer le tissu normal du tissu pathologique et ont proposé des marqueurs ou des profils protéiques différents [39, 40]. Diamandis [41] a mis en exergue de nombreux paramètres qui affectent la reproductibilité de cette technique : la variabilité dans le recueil des échantillons, leur traitement, le type de conservation, la diversité des groupes de patients, leur statut hormonal, leurs habitudes alimentaires, l'usage de médicaments, ainsi que les biais statistiques ou la variation de la stabilité des spectromètres de masse et/ou des puces à protéines. De même, la complexité des outils informatiques augmente la probabilité d'interprétations erronées et de résultats non reproductibles.

Par ailleurs, la sensibilité de la détection n'atteint pas les concentrations inférieures à 1 microgramme par ml, alors que les marqueurs tumoraux usuels sont à des concentrations beaucoup plus faibles et donc insuffisamment détectés. De sorte que, jusqu'à présent, dans les quelques cas où la caractérisation des marqueurs a été effectuée, les protéines identifiées correspondent à des protéines majoritaires du sérum. Il s'agit, notamment, de l'apolipoprotéine A, des formes tronquées de la transthyrétine, de la chaîne lourde de l'inhibiteur de l'alpha-trypsin et de la sous-unité alpha de l'haptoglobine dans le cancer de l'ovaire [40, 42], des alpha 1 et alpha 2 défensine dans le cancer de la vessie [43], ou encore d'une protéine de liaison à la vitamine D dans le cancer de la prostate [44]. Il reste à savoir si ces marqueurs ont leur expression altérée spécifiquement en réponse à la prolifération tumorale ou de manière non spécifique en réponse à des épiphénomènes dépendant de la tumeur.

Les biomarqueurs identifiés jusqu'ici par SELDI-TOF se sont révélés, pour la plupart, des protéines majoritaires de la réponse inflammatoire produites par l'environnement péri-tumoral ou par les cellules immunitaires plutôt que par la tumeur elle-même [44-46]. Ces protéines sont, néanmoins, potentiellement instructives s'il est démontré qu'il s'agit de fragments protéolytiques dérivés des protéines inflammatoires de la tumeur, spécifiques de chaque tumeur en fonction de son contenu enzymatique [46].

Liotta et al. ont observé que certains des marqueurs identifiés par SELDI-TOF étaient des formes dégradées de protéines sériques, ce qui fait avancer l'hypothèse que l'abondance de ces marqueurs clivés est le reflet direct d'événements pathologiques induits par le microenvironnement tumoral [47]. Des études récentes montrent que l'équilibre entre des protéases et leurs inhibiteurs cellulaires est modifié dans le sérum et le tissu des patients en réponse à la prolifération tumorale [48]. Différents membres des familles de protéases, comme les métalloprotéases ou les kallikréines plasmiques et tissulaires, ont leur expression augmentée ou diminuée dans certains cancers [49-51]. Ces modifications pourraient avoir un retentissement direct sur la capacité des protéases à cliver des protéines sériques et à générer ainsi une signature moléculaire spécifique. Malgré la bonne sensibilité de la technique SELDI-TOF, la détection de ces protéines minoritaires est encore délicate, car elle est gênée par la présence de protéines majoritaires telles que l'albumine et les immunoglobulines [41]. Ainsi, la PSA, qui fait partie des protéases dont l'expression est augmentée dans les cancers de la prostate [52], n'a jamais pu être

identifiée par le SELDI-TOF. En fait, il existe des méthodes qui permettent d'augmenter la concentration relative des protéines faiblement représentées telles que des étapes successives de préfractionnement, de chromatographie, de précipitation sélective et de déplétion des protéines majoritaires [53-56]. La détection de la fraction du sérum représentant ces protéines minoritaires est un défi technologique nécessaire à surmonter pour assurer le développement du diagnostic des formes précoces de cancer.

Conclusion

L'utilisation des nouvelles technologies d'analyse du génome et du protéome donne des premiers résultats qui mettent en évidence le potentiel des analyses à large échelle. Les limitations technologiques et les défis analytiques sont encore élevés et des progrès importants s'imposent pour établir la complémentarité entre protéomique d'expression et protéomique d'interaction. À l'instar du programme visant à établir la carte d'identité des tumeurs humaines par l'analyse du transcriptome, l'approche complémentaire du gène à la protéine fonctionnelle, alliant génomique et protéomique, devrait faire l'objet de programmes nationaux coordonnés entre les diverses plateformes protéomiques cancérologiques pour concrétiser, dans les meilleurs délais, la caractérisation des marqueurs et le développement de tests non invasifs prédictifs et diagnostiques des formes précoces de cancer les plus accessibles aux moyens thérapeutiques actuels.

Références bibliographiques

- [1] Spicer J, Harries M, Ellis P. Adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer. *Lancet* 2005; 366(9486): 634.
- [2] Janicke F et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:913-20.
- [3] Steeg PS, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52:17-28.
- [4] Raetz EA, Moos PJ. Impact of microarray technology in clinical oncology. *Cancer Invest* 2004; 22: 312-20.
- [5] Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 2005; 365:488-92.
- [6] Kallioniemi A et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258:818-21.
- [7] Kallioniemi OP et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10:231-43.
- [8] Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004; 66:488-95.
- [9] Perou CM et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406:747-52.
- [10] Sorlie T et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8418-23.

- [11] Van de Vijver MJ et al. V. *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature* 2002; 415: 530-6.
- [12] Van de Vijver MJ et al. *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med* 2002; 19, 347(25): 1999-2009.
- [13] Sotiriou C et al. *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from population-based study. Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10393-8.
- [14] Sorlie T et al. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869-74.
- [15] Piccart MJ et al. *Multicenter external validation study of the Amsterdam 70-gene prognostic signature in node negative untreated breast cancer: are the results still outperforming the clinical-pathological criteria? Breast Cancer Res Treat* 2004; 88(Suppl. 1): abstr. 38.
- [16] Wang Y et al. *Pathway analysis and validation of the 76-gene prognostic signature in lymph node negative primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat* 2004; 88(Suppl. 1), S20:abstr. 103.
- [17] Hedenfalk I et al. *Gene-expression profiles in hereditary breast cancer N Engl J Med* 2001; 344:539-48.
- [18] Jazaeri AA et al. *Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked and sporadic ovarian cancer. J Natl Cancer Inst* 2002; 94:990-1000.
- [19] Chang JC et al. *Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. Lancet* 2003; 362: 362-9.
- [20] Ayers M et al. *Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol* 2004; 22:2284-93.
- [21] West M et al. *Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:11462-7.
- [22] Gruvberger S et al. *Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. Cancer Res* 2001;61:5979-84.
- [23] Paik S et al. *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med* 2004; 351:2817-26.
- [24] Paik S et al. *Expression of the 21 genes in the Recurrence Score assay and prediction of clinical benefit from tamoxifen in NSABP study B-20. Breast Cancer Res Treat* 2004; 88(Suppl. 1)S23:abstr. 24.
- [25] Shekouh AR et al. *Application of laser capture microdissection combined with two-dimensional electrophoresis for the discovery of differentially regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. Proteomics* 2003; 3(10):1988-2001.
- [26] Wulfkuhle JD et al. *Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. Cancer Res* 2002; 62(22):6740-9.
- [27] Somiari RI, Somiari S, Russell S, Shriver CD. *Proteomics of breast carcinoma. J Chromatography B* 2005; 815:215-25.
- [28] Somiari RI et al. *High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. Proteomics* 2003; 3(10):1863-73.
- [29] Petricoin EF et al. *Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet* 2002; 359:572-7.
- [30] Petricoin EF, Ornstein DK, Paweletz CP, Ardekani A, Hackett PS, Hitt BA et al. *Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1576-8.
- [31] Chen YD, Zheng S, Yu JK, Hu X. *Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. Clin Cancer Res* 2004; 10:8380-5.
- [32] Becker S et al. *Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer. Ann Surg Oncol* 2004; 11:907-14.

- [33] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48:1296-304.
- [34] Pusztaï L et al. Pharmacoproteomic analysis of prechemotherapy and postchemotherapy plasma samples from patients receiving neoadjuvant or adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* 2004; 100:1814-22.
- [35] Vlahou A et al. A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003; 4:203-9.
- [36] Paradis V et al. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2004; 41:40-7.
- [37] Wilson LL, Tran L, Morton DL, Hoon DS. Detection of differentially expressed proteins in early-stage melanoma patients using SELDI-TOF mass spectrometry. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022:317-22.
- [38] Koopmann J et al. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004; 10:860-8.
- [39] Diamandis EP. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3:367-78.
- [40] Zhang Z et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64:5882-90.
- [41] Diamandis EP. Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:353-6.
- [42] Ye B et al. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2003;9:2904-11.
- [43] Vlahou A et al. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001; 158:1491-502.
- [44] Hlavaty JJ et al. Identification and preliminary clinical evaluation of a 50,8-kDa serum marker for prostate cancer. *Urology* 2003; 61:1261-5.
- [45] Diamandis EP. Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet* 2002; 360:170;author reply 170-1.
- [46] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-7.
- [47] Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature* 2003; 425:905.
- [48] Mehta AI et al. Biomarker amplification by serum carrier protein binding. *Dis Markers* 2003; 19:1-10.
- [49] Mok SC et al. Prostatein, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1458-64.
- [50] Matrisian LM, Sledge GW Jr, Mohla S. Extracellular proteolysis and cancer: meeting summary and future directions. *Cancer Res* 2003; 63: 6105-9.
- [51] Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001; 22: 184-204.
- [52] Chauvet B, Villers A, Davin JL, Nahon S. Update on screening, diagnosis and treatment of cancer of the prostate. *Bull cancer* 2002; 89: 37-45.
- [53] Govorukhina NI et al. Sample preparation of human serum for the analysis of tumor markers. Comparison of different approaches for albumin and gamma-globulin depletion. *J Chromatogr A* 2003; 1009:171-8.
- [54] Merrell K et al. Analysis of low-abundance, low-molecular-weight serum proteins using mass spectrometry. *J Biomol Tech* 2004; 15: 238-48.
- [55] Solassol J et al. Proteomic detection of prostate-specific antigen using a serum fractionation procedure: potential implication for new low-abundance cancer biomarkers detection. *Anal Biochem* 2005; 338(1): 26-31.

[56] Wang YY, Cheng P, Chan DW. A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis. *Proteomics* 2003; 3: 243-8.

[57] Lacroix L, Lazar V, Bidart JM. Méthodes d'analyse de l'expression des gènes à haut débit: les puces à ADN. *La Lettre du Sénologue* 2005; 28: 15-9.