



HAL
open science

Protéomique et cancer du sein : en théorie et en pratique

Frédérique Spyratos

► **To cite this version:**

Frédérique Spyratos. Protéomique et cancer du sein : en théorie et en pratique. 26èmes Journées de la Société française de sénologie et de pathologie mammaire (SFSPM), Nov 2004, Nancy, France. pp.46-53. hal-03573601

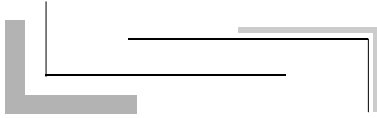
HAL Id: hal-03573601

<https://hal.science/hal-03573601>

Submitted on 14 Feb 2022

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.



Protéomique et cancer du sein : en théorie et en pratique

Proteomic and breast cancer: theory and practice

Mots clés : Protéomique, Cancer du sein, Marqueur.

Keywords : Proteomics, Breast cancer, Marker.

F. Spyrtos ⁽¹⁾

Q u'est-ce que la protéomique ?

Jusqu'aux années 1980, l'essentiel de la recherche biologique a suivi un schéma qualifié depuis d'hypothético-déductif et réductif. Dans le champ de la biologie cancérologique, cela s'est traduit par l'étude au niveau protéique de facteurs individuels, pronostiques et/ou prédictifs liés, dans la plupart des cas, à une hypothèse biologique. Les outils utilisables en pratique clinique courante ne permettaient pas encore d'appréhender le caractère pléiomorphe, évolutif et instable des tumeurs. L'approche réductionniste et ponctuelle, consistant à isoler un paramètre de son contexte alors qu'il existe, au sein de la tumeur, une accumulation d'altérations, est alors apparu sinon simpliste, du moins préliminaire et limitée. Les dernières années ont été marquées par l'émergence du concept de biologie à grande échelle qui repose sur le postulat selon lequel les systèmes biologiques sont des réseaux complexes, une étude à l'échelle la plus grande possible apportant forcément un surcroît de connaissances. La conceptualisation de cette approche a été appliquée d'abord aux acides nucléiques, du fait de la maturité des outils utilisés pour le clonage et le séquençage de l'ADN. Ils permettent, par exemple, l'analyse à grande échelle de profils d'expression de gènes (biopuces à ADN ou ARN).

Cependant, la "réalité" cellulaire dépend de l'emploi du répertoire constitué par le génome d'une cellule, en termes de choix de protéines exprimées, de niveaux d'expression des produits des gènes, de modulation de la fonctionnalité des protéines (par des modifications post-traductionnelles par exemple) et, enfin, du fonctionnement des protéines sous forme de complexes multimoléculaires. Le génome est, par définition, statique alors que les protéines exprimées répondent aux conditions de l'endroit et du moment. L'étude des protéines est donc

1. Laboratoire d'oncobiologie, centre René-Huguenin, Saint-Cloud.

plus proche de la physiologie cellulaire. L'ensemble des protéines contenues dans une cellule est encore plus vaste, complexe et dynamique que le génome. En effet, chaque gène peut produire plusieurs protéines, acteurs-clés du métabolisme cellulaire, et qui peuvent elles-mêmes être modifiées par la machinerie cellulaire. Dans la plupart des maladies, le niveau d'activité des protéines est affecté, l'étude de leur dynamique est donc essentiel pour une meilleure compréhension des mécanismes de démarrage ou de progression des maladies.

L'étude des protéines à grande échelle est devenue une branche nouvelle de la biochimie. Le protéome, terme proposé en 1995, désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe à un moment donné. L'analyse protéomique permet une description dynamique de la régulation de l'expression des gènes, grâce à l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles [1-4].

Par dérive sémantique, une approche de type protéomique ne désigne aujourd'hui plus seulement des travaux visant à caractériser le protéome d'une cellule entière, mais plutôt une étude utilisant les techniques de la protéomique (électrophorèse et spectrométrie de masse) pour identifier de manière systématique les protéines contenues dans un échantillon plus ou moins complexe.

L'analyse protéomique permet notamment :

- la recherche et l'identification systématique de l'ensemble des protéines constituant un organisme, un tissu, une fraction cellulaire... ;
- l'identification des protéines constituant un complexe protéique (interactions protéines-protéines) ;
- la recherche et l'identification de protéines impliquées dans des voies de signalisation, par exemple par une analyse différentielle (sauvage/mutant).

Le développement et l'utilisation pratique de la protéomique ont longtemps été limités par la lourdeur des technologies et la grande quantité de matériel nécessaire pour l'analyse.

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

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

Dans le domaine cancérologique, des publications paraissaient régulièrement, toutes localisations confondues, utilisant des techniques et des appareillages réservés à des structures très spécialisées. Toute utilisation de ces méthodes semblait inapplicable en pratique clinique jusqu'en 2002 où une série d'articles utilisant une méthodologie plus simple de puces à protéines (Proteinchip® CIPHERGEN) décrite plus loin, soulevait à la fois espoirs et polémiques comme on va le voir [5, 6].

Après avoir présenté rapidement les différentes approches méthodologiques de protéomique, on présentera les études réalisées le plus souvent par des techniques classiques dans le cancer du sein. On verra ensuite dans quelle mesure on pouvait justifier l'enthousiasme

suscité par l'avènement de techniques de "puces à protéines" dans les applications cancérologiques, essentiellement dans le dépistage au niveau sérique du cancer de l'ovaire et du cancer de la prostate, avant de conclure sur ce que l'on pouvait attendre raisonnablement des nouvelles générations de techniques de protéomique.

Principales techniques de protéomique

- L'analyse protéomique peut être séparée en différentes étapes :
- préparation des échantillons ;
 - séparation des protéines par des techniques chromatographiques ou électrophorétiques (gels d'électrophorèse mono- ou bidimensionnelle, électrophorèse capillaire, supports solides ou billes, puces à protéines...);
 - analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, ms/ms, SELDI-TOF...);
 - interrogations des banques de données.

Méthode classique : séparation par électrophorèse bidimensionnelle, puis identification par spectrométrie de masse

Classiquement, les protéines contenues dans l'échantillon biologique étudié sont d'abord solubilisées, puis séparées par électrophorèse bidimensionnelle, et identifiées par spectrométrie de masse [1, 2].

L'électrophorèse bidimensionnelle est une méthode très résolutive de séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire. La première dimension sépare les protéines selon leur pI dans un gel de polyacrylamide comportant un gradient de pH. L'utilisation des gradients de pH immobilisés a considérablement accru la reproductibilité, la flexibilité et la capacité des séparations par électrophorèse bidimensionnelle. La deuxième dimension utilise l'électrophorèse en présence de SDS (sodium dodecylsulfate), qui sépare les protéines selon leur masse. La première dimension est celle qui apporte le surcroît d'information le plus net, en séparant les isoformes ou les formes modifiées des protéines (par exemple phosphorylées ou glycosylées). En revanche, cette première dimension est aussi le point faible de la technique : le fait d'amener les protéines à leur pI limite la capacité de la séparation, car le pI représente le point de solubilité minimale.

Il faut ensuite procéder au traitement et à la mise en image de la séparation protéique qui permet d'établir une carte peptidique. On peut colorer spécifiquement les protéines (bleu de Coomassie, argent...), utiliser une révélation par fluorescence, chimioluminescence, isotopes radioactifs... Des progrès considérables ont été faits dans le traitement de l'image. Des logiciels performants permettent de détecter et de caractériser les taches protéiques, de comparer entre elles les cartes afin d'établir des cartes de référence. Cette étape reste, malgré ces progrès, la grande difficulté de l'analyse protéomique classique.

Il est possible au moyen de l'électrophorèse bidimensionnelle d'analyser, simultanément et de façon quantitative (à 10 % près environ), l'expression d'un millier de protéines, en prenant en compte l'ensemble des phénomènes de régulation, y compris la majorité des régulations post-traductionnelles, qui modifient souvent le pI. Toutes ces modifications seront identifiables à partir d'un gel bidimensionnel.

Jusqu'à ces dernières années, l'étape de l'identification des protéines, correspondant à un spot donné sur une électrophorèse bidimensionnelle, était difficile ou lourde à mettre en œuvre (immunodétection, séquençage N-terminal ou microséquençage d'Edman). Aujourd'hui, la mise au point de techniques d'identification à grande échelle a transformé cette étape : la première avancée est le séquençage du génome dont la généralisation permet le développement concomitant de bases de données protéiques et des outils informatiques nécessaires à leur exploitation. La seconde avancée concerne l'ensemble des progrès liés à l'instrumentation de la spectrométrie de masse adaptée à l'analyse de milieux biologiques complexes. On utilise aujourd'hui une technique couplant l'électrophorèse bidimensionnelle à la sensibilité et à la précision de la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse permet la séparation des protéines en fonction du rapport de leur masse (m) à la charge (z) qu'elles acquièrent lors d'une excitation (m/z). Des aménagements technologiques récents, soit sur les modalités d'excitation, soit sur la séparation proprement dite, permettent des analyses à haut débit. En biologie clinique, la spectrométrie de masse MALDI-TOF est la méthode la plus couramment utilisée. MALDI caractérise la modalité d'excitation (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) et TOF la modalité de séparation (Time Of Flight).

La protéine, repérée sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle après coloration à l'argent par exemple, est digérée par la trypsine à l'intérieur même du gel de polyacrylamide. L'ensemble des masses des peptides générés par la trypsine constitue la carte peptidique massique de la protéine. Les masses lues recouvrent 94 % de la séquence totale de la protéine. Celle-ci constitue une véritable empreinte digitale de la protéine : des logiciels sont en effet capables d'identifier la protéine digérée en comparant la carte peptide massique obtenue aux cartes peptidiques massiques théoriques déduites des séquences de chaque protéine présente dans les banques de données (après avoir effectué une digestion fictive de ces protéines par la trypsine). Cette approche permet d'identifier les protéines, à condition bien sûr que celles-ci soient recensées dans les banques de données. Lorsque la protéine n'est pas présente dans ces banques, il est possible d'obtenir des informations sur la séquence en acides aminés des peptides tryptiques en étudiant les masses des produits de fragmentation de ces peptides en mode MS/MS (double spectrométrie) à l'aide d'un spectromètre de masse de type "nano-electrospray". L'échantillon protéique en solution est soumis d'abord à un champ électrique intense qui entraîne sa pulvérisation en gouttelettes de plus en plus fines, jusqu'à l'obtention d'ions protéiques chargés étudiés dans un second analyseur en temps de vol qui donne accès à sa séquence peptidique.

L'étude de la carte peptidique massique d'une protéine permet également d'identifier et de localiser d'éventuelles modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation,...). Ces modifications se traduisent, en effet, sur la carte peptidique massique par des peptides présentant des incréments de masse (par exemple 80 Da pour une phosphorylation) par rapport aux masses théoriques attendues d'après la séquence en acides aminés de la protéine. De même, une mutation pourra être détectée et localisée par une "anomalie" dans la carte peptidique massique de la protéine.

Il s'avère aujourd'hui que le pouvoir résolutif des gels d'électrophorèse bidimensionnels couplé aux développements récents des techniques d'analyse par spectrométrie de masse relancent de façon spectaculaire la microanalyse des protéines comme moyen performant pour contribuer à résoudre les questions posées par l'étude de la cellule. Les limites de cette approche, essentiellement dues à l'électrophorèse bidimensionnelle, concernent les difficultés à analyser des protéines

minoritaires ou membranaires, et les limites en termes de débit d'analyse et de miniaturisation. D'autres schémas d'analyse protéomique ont donc été développés.

Chromatographie et spectrométrie de masse : "puces à protéines"

Pour des raisons de miniaturisation, les techniques chromatographiques se sont implantées sous forme non pas de colonnes, mais de surfaces d'adsorption planes ou de billes. Des sociétés (comme CIPHERGEN et BRUKER) ont développé des méthodes de "purification" des protéines préalables à la constitution du spectre. Le principe consiste donc à déposer un échantillon complexe (sérum, urine, extrait tissulaire...) sur la surface chromatographique contenant 8 à 24 sites actifs de 1 mm de diamètre constitués de surfaces chimiques ou biochimiques, et permettant la capture sélective des protéines d'intérêt. L'échantillon est alors élué partiellement jusqu'à ce qu'un nombre de protéines compatible avec la résolution du spectromètre de masse soit adsorbé. Dans le cas de la plate-forme Proteinchip® de CIPHERGEN, des barrettes permettent l'adsorption sélective de groupes de protéines, l'interaction avec la matrice et l'excitation, on parle alors de SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization). Dans cette technologie, ce qui est retenu sur la surface chromatographique est analysé en spectrométrie de masse. Dans une variante (gamme Autoflex® de BRUKER), on analyse les éluats successifs de l'échantillon complexe adsorbé sur des billes ; la complexité de l'échantillon est mieux prise en compte.

Ces systèmes sont utilisés de manière comparative (par exemple, étude de profils différentiels obtenus à partir de sérum normal et de sérum de patients atteints de pathologie cancéreuse). Du fait de leur miniaturisation, ces techniques sont bien adaptées à l'analyse d'échantillons contenant de faibles concentrations protéiques. Leur simplicité d'utilisation les rend accessibles à des laboratoires moins spécialisés que ceux utilisant les techniques classiques. Il faut cependant bien réaliser qu'une bonne connaissance de la chimie des protéines reste le préalable indispensable à une utilisation optimale de ces méthodologies. Elles ont également des limites : elles sont plutôt adaptées à l'analyse de protéines de petite taille et du fait même du principe de l'analyse, la perte en nombre de marqueurs potentiels est considérable.

La protéomique est une approche récente ; de ce fait, elle est encore très perfectible, au niveau de toutes les étapes d'analyse.

Protéomique et cancer du sein

En cancérologie, l'analyse protéomique permet, en théorie, l'identification de profils protéiques et de marqueurs biologiques pour favoriser un diagnostic précoce, prédire l'évolution, suivre les patients en cours de traitement et aider à la définition de nouvelles classes de médicaments.

L'exemple du cancer du sein illustre bien les avancées significatives obtenues ces dernières années avec les progrès récents de l'électrophorèse-2D, de la spectrométrie de masse et de l'arrivée des puces à protéines dans différents axes :

- Établissement de cartes d'expression protéique de différents types de cellules épithéliales du sein normal ou de lignées de cellules tumorales. Ces travaux ont établi les bases statistiques de l'analyse des électrophorèses-2D et permis de construire des banques de données [7, 8].
- Obtention de cartes d'expression différentielles. De nombreuses protéines sous-exprimées ou sur-

exprimées dans les cellules tumorales ont ainsi été caractérisées, éventuellement après microdissection de composants invasifs et in situ [9, 10]. Le groupe de *Hondermarck* [10-13] a comparé des profils protéomiques de cellules normales, de cellules cancéreuses et des tumeurs. Il a mis en évidence une diminution significative de l'expression de la protéine 14-3-3 sigma (impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire) dans les cancers du sein par rapport aux cellules mammaires normales.

- Protéomique spécifique et fonctionnelle. Certaines modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou la glycosylation ont été utilisées pour caractériser un mécanisme de prolifération des cellules tumorales [14].
- Caractérisation de familles de protéines intracellulaires après marquage d'affinité ou après purification par chromatographie d'affinité [15].

Des résultats préliminaires ont été aussi rapportés utilisant les puces à protéines Proteinchip® dans différents milieux biologiques. Dans tous les cas, des profils protéiques différentiels ont été mis en évidence, sans identification formelle des protéines : sérums de femmes ayant des pathologies du sein bénignes et malignes [16], liquides d'aspiration mamelonnaire de femmes normales et porteuses de cancers du sein [17], plasmas de patientes ayant reçu différents protocoles de chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante [18]. Il s'agit, dans tous les cas, d'études très préliminaires avec des insuffisances de données de reproductibilité et de répétabilité.

Polémiques autour de la technique Proteinchip® Ciphergen


Les premiers travaux publiés utilisant des “puces à protéines” ont été réalisés par la technologie Proteinchip® Ciphergen sur sérum et ils visaient le diagnostic précoce de certaines tumeurs dont les cancers de l'ovaire et de la prostate [5, 6]. Ils rapportaient qu'un profil protéomique déterminé dans le sérum était capable de diagnostiquer les cancers de l'ovaire et de la prostate avec une spécificité et une sensibilité jamais égalée jusque-là avec les marqueurs classiques. Ces résultats avaient été rapidement relayés par la presse populaire, les scientifiques et même les politiciens, générant un enthousiasme sans doute disproportionné. Des critiques ont commencé à être publiées [19, 24] suggérant que les étapes de standardisation et de validation nécessaires avant l'utilisation de cette méthode avaient été sous-estimées dans les premières publications. Le premier point concernait le potentiel de reproductibilité de ce type de technique. Reprenant les articles publiés sur le cancer de la prostate, *Diamandis* [20] constatait que deux groupes de recherche utilisant les mêmes approches expérimentales, mais pas les mêmes outils informatiques, ne mettaient pas en évidence les mêmes pics permettant de discriminer le tissu normal du tissu tumoral. Par ailleurs, les marqueurs habituels retrouvés dans le cancer de la prostate n'étaient pas retrouvés. *Diamandis* posait également la question de la sensibilité de la détection de la technologie Proteinchip® qui ne semble pas capable de détecter des protéines à une concentration inférieure à 1 µg/ml. Les marqueurs tumoraux usuels sont à des concentrations beaucoup plus faibles. Avec une certaine ironie, *Diamandis* souligne que les protéines proposées comme “nouveaux” marqueurs par la technologie Proteinchip®, comme l'apoprotéine A1, l'haptoglobine α , avaient été proposées il y a trente ans puis abandonnées en raison de leur faible spécificité et sensibilité. Les différences observées entre les sérums contrôles et les sérums des patients porteurs de cancers n'étaient donc peut-être pas exclusivement liées au cancer. Les données sur de nombreux points qui affectent reproductibilité et répétabilité

des techniques ont aussi été soulignées [21] : effet de paramètres tels que la variabilité dans le recueil des échantillons, leur traitement et le type de conservation, les caractéristiques des populations étudiées en termes de sexe, ethnicité, statut hormonal, habitudes nutritionnelles, usage de médicaments..., les biais statistiques, la variation de la stabilité de la spectrométrie de masse, et des puces à protéines. L'utilisation d'outils informatiques complexes pour analyser les données augmente la probabilité de mener trop loin un apprentissage, voire de modéliser le bruit de fond (*overfitting*) et donc d'obtenir des résultats erronés et non reproductibles. Le groupe de *Petricoin* a reconnu que beaucoup de travail restait à faire pour valider ces nouvelles approches et que les premières publications n'avaient pour but que de montrer la faisabilité de ces nouvelles techniques. Ils ont aussi convenu que l'étape d'identification des protéines est indispensable et que l'on ne peut se contenter de profils différentiels de pics non identifiés comme ce fut le cas des premières publications [25, 26]. Face à l'agressivité de ses contradicteurs, il ose l'analogie avec l'accueil incrédule et dubitatif réservé au premier vol stabilisé (260 mètres en 59 secondes) d'un appareil à moteur plus lourd que l'air en 1903 par les frères Wright, à Kitty Hawk, en Caroline du Nord [27]. Ils avaient fourni la preuve qu'un tel appareil pouvait voler. C'était aussi le point de départ de l'aéronautique moderne...

On est ainsi passé d'un excès d'enthousiasme à une vision trop négative de technologies nouvelles, niant leur intérêt potentiel indiscutable et ne leur laissant pas le temps de faire leurs preuves. L'objectivité et la sérénité, indispensables en sciences et en médecine, s'accommodent mal des moyens modernes de communication et de médiatisation, et les puces à protéines sont un bon exemple des dérives qui peuvent en découler.

Les premiers résultats portant sur l'étude de systèmes biologiques complexes qui commencent à être publiés, mettent en lumière le potentiel de ces analyses à large échelle. Cependant, il faut garder en mémoire que les outils, les concepts et les méthodes d'analyse de l'information générée par ces approches sont encore en plein développement.

Après la révolution génomique, la communauté internationale s'organise autour du protéome humain. Des efforts internationaux cherchent à structurer la recherche en protéomique. Au début de l'année 2001, un organisme portant sur le protéome, le Human Proteome Organization (HUPO), a été fondé afin de rassembler l'expertise internationale dans ce domaine. Sur un plan conceptuel, les idées évoluent aussi et certains commencent à s'élever contre la dictature du "tout génétique" [28]. L'édification d'un être dépend des gènes, mais aussi de mécanismes relevant d'une véritable sociologie cellulaire et du jeu complexe des interactions avec l'environnement pris dans son sens le plus large.

L'utilisation de l'analyse protéomique est appelée à se généraliser, en complémentarité avec la génomique, tant en recherche fondamentale qu'en biomédecine ou en pharmacologie, où elle constitue désormais un outil puissant pour l'identification de marqueurs associés à une pathologie et de cibles thérapeutiques. Mais dans le champ des applications cliniques, les limitations technologiques sont importantes et le défi analytique reste immense. 

Références bibliographiques

[1] Thebault S, Machour N, Perrot F, Jouenne T, Lange C, Hubert M et al. *Objet et évolution méthodologique de l'analyse protéomique. Med Sci (Paris) 2001;5(17):609-18.*

- [2] Vercoutter-Edouart AS, Peyrat JP, Lemoinen J, Hondermarck H. Analyse protéomique: pourquoi-comment? *Bull Cancer* 2001;88(7):663-70.
- [3] Lescuyer P, Chevallet M, Rabilloud T. L'analyse protéomique: concepts, réalités et perspectives. *Med Sci (Paris)* 2004;20(5):587-92.
- [4] Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(4):267-75.
- [5] Petricoin EF 3rd, 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(20):1576-8.
- [6] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359(9306):572-7.
- [7] Giometti CS, Williams K, Tollaksen SL. A two-dimensional electrophoresis database of human breast epithelial cell proteins. *Electrophoresis* 1997;18(3-4):573-81.
- [8] Page MJ, Amess B, Townsend RR, Parekh R, Herath A, Brusten L et al. Proteomic definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(22):12589-94.
- [9] Wulfkuhle JD, Sgroi DC, Krutzsch H, McLean K, McGarvey K, Knowlton M et al. Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002;62(22):6740-9.
- [10] Somiari RI, Sullivan A, Russell S, Somiari S, Hu H, Jordan R et al. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* 2003;3(10):1863-73.
- [11] Hondermarck H, Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Vercoutter-Edouart AS, Adriaenssens E, Lemoine J. Functional proteomics of breast cancer for signal pathway profiling and target discovery. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(4):395-405.
- [12] Hondermarck H. Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Mol Cell Proteomics* 2003;2(5):281-91.
- [13] Adriaenssens E, Lemoine J, El Yazidi-Belkoura I, Hondermarck H. Growth signaling in breast cancer cells: outcomes and promises of proteomics. *Biochem Pharmacol* 2002;64(5-6):797-803.
- [14] Dwek MV, Ross HA, Leatham AJ. Proteome and glycosylation mapping identifies post-translational modifications associated with aggressive breast cancer. *Proteomics* 2001;1(6):756-62.
- [15] Journet A, Chapel A, Kieffer S, Roux F, Garin J. Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics* 2002;2(8):1026-40.
- [16] 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(8):1296-304.
- [17] Sauter ER, Zhu W, Fan XJ, Wassell RP, Chervoneva I, Du Bois GC. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid to detect biologic markers of breast cancer. *Br J Cancer* 2002;86(9):1440-3.
- [18] Puzstai L, Gregory BW, Baggerly KA, Peng B, Koomen J, Kuerer HM et al. Pharmacoproteomic analysis of pre-chemotherapy and postchemotherapy plasma samples from patients receiving neoadjuvant or adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* 2004;100(9):1814-22.
- [19] Diamandis EP. Point: Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics? *Clin Chem* 2003;49(8):1272-5.
- [20] Diamandis EP. Re: Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(6):489-90; author reply 490-1.
- [21] Diamandis EP. Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(5):353-6.
- [22] Diamandis EP. How are we going to discover new cancer biomarkers? A proteomic approach for bladder cancer. *Clin Chem* 2004;50(5):793-5.
- [23] Coombes KR, Fritsche HA Jr, Clarke C, Chen JN, Baggerly KA, Morris JS et al. Quality control and peak finding for proteomics data collected from nipple aspirate fluid by surface-enhanced laser desorption and ionization. *Clin Chem* 2003;49(10):1615-23.
- [24] Rogers MA, Clarke P, Noble J, Munro NP, Paul A, Selby PJ et al. Proteomic profiling of urinary proteins in renal cancer by surface enhanced laser desorption ionization and neural-network analysis: identification of key issues affecting potential clinical utility. *Cancer Res* 2003;63(20):6971-83.
- [25] Garber K. Debate rages over proteomic patterns. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(11):816-8.
- [26] Tuma RS. Proteomics: from signature to protein identification. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(11):817.
- [27] Petricoin EF, Fishman DA, Conrads TP, Veenstra TD, Liotta LA. Lessons from Kitty Hawk: From feasibility to routine clinical use for the field of proteomic pattern diagnostics. *Proteomics* 2004;4(8):2357-560.
- [28] Kupiec JJ, Sonigo P. Ni Dieu ni gène, pour une autre théorie de l'hérédité. Collection Science ouverte. Paris: Seuil, 2000.