



HAL
open science

Potentiel de la spectrométrie de masse pour l'identification de biomarqueurs des pathologies cutanées

Mélissa Dussoyer, Catherine Moali, Priscillia Lagoutte

► To cite this version:

Mélissa Dussoyer, Catherine Moali, Priscillia Lagoutte. Potentiel de la spectrométrie de masse pour l'identification de biomarqueurs des pathologies cutanées. *Biologie Cutanée*, 2022, pp.7-18. hal-03838431

HAL Id: hal-03838431

<https://hal.science/hal-03838431>

Submitted on 23 Nov 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

1

Potentiel de la spectrométrie de masse pour l'identification de biomarqueurs des pathologies cutanées

Mélissa Dussoyer, Catherine Moali* et Priscillia Lagoutte

Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique – CNRS UMR5305,
Université de Lyon

*Auteur pour la correspondance : catherine.moali@ibcp.fr

I – Introduction

Le recours aux biomarqueurs pour révéler l'état physiopathologique de la peau ne s'impose pas d'emblée car les signes de dysfonctionnement de cet organe sont souvent visibles à l'œil nu et plus faciles à détecter que dans les organes internes. Cependant, l'état du derme et de l'hypoderme peut être difficile à caractériser par une inspection superficielle et, dans certains cas, il serait bénéfique de disposer d'indicateurs prédictifs sensibles de l'évolution d'une pathologie cutanée. Les biomarqueurs tissulaires ou circulants ont donc toute leur place en biologie cutanée pour mettre en évidence des processus annonciateurs d'une dérive plus grave ou rendre compte de l'état des couches inférieures de la peau. Ils peuvent aussi servir à sélectionner les patients qui pourraient répondre préférentiellement à une thérapie et à suivre l'efficacité d'un traitement.

En biologie de la peau comme dans d'autres domaines, les méthodes omiques ont déjà fait la preuve de leur potentiel pour révéler les acteurs moléculaires impliqués dans une pathologie. Après l'ère de la génomique, une transition rapide s'est opérée vers la transcriptomique puis vers la protéomique pour identifier de nouveaux gènes ou protéines particulièrement dérégulés dans un contexte spécifique. Les nouvelles générations de spectromètres de masse utilisés en protéomique permettent actuellement de couvrir les protéomes avec une très bonne profondeur qui donne une information enrichie par rapport à l'étude des gènes et des ARNs. Un seul gène peut en effet donner

lieu à de multiples protéoformes (variants d'épissage, modifications post-traductionnelles), possédant souvent des activités différentes et qu'il est important de mieux connaître pour en appréhender la pertinence physiopathologique. Par ailleurs, les études transcriptomiques ne rendent compte que de la néosynthèse des protéines mais non de leur stabilité ou *turnover* global alors qu'il est connu que la demi-vie de certaines protéines importantes de la peau comme l'élastine peut atteindre plusieurs dizaines d'années.

Dans le contexte de la recherche de biomarqueurs, l'étude des protéines en spectrométrie de masse (MS) requiert leur transformation en peptides de plus petite taille (idéalement entre 5 et 25 acide aminés) dont la séquence est plus facile à identifier à partir des données obtenues que celle des protéines entières. Pour cela, des étapes de réduction et alkylation des protéines, pour éliminer les ponts disulfures, et de digestion enzymatique par des protéases de spécificité connue (par exemple la trypsine ou l'endoprotéinase GluC) sont habituellement intégrées au traitement des échantillons. Par ailleurs, plus que la description qualitative du protéome d'un échantillon biologique, c'est l'estimation des quantités de protéines qui se révèle la plus utile en recherche comme en clinique. En spectrométrie de masse, deux types d'approches quantitatives peuvent être utilisées (Emadali and Gallagher-Gambarelli, 2009; Lindemann et al., 2017) :

- la quantification relative, utilisée pour des analyses globales en protéomique de découverte (*discovery proteomics* en anglais) car permettant de comparer simultanément l'abondance de nombreuses protéines dans différents échantillons sans *a priori* sur leur nature.
- la quantification absolue, qui vise à déterminer la quantité exacte d'un ou plusieurs biomarqueurs déjà identifié(s) ou en cours de validation, dans une unité exploitable (masse, moles etc). Cette approche est également souvent assimilée à la protéomique ciblée (*targeted proteomics* en anglais) dans la mesure où les cibles intéressantes ont été préalablement définies.

Les approches de quantification relative sont utilisées en recherche fondamentale comme appliquée, pour étudier des échantillons dans leur globalité. En effet, dans de nombreux cas, c'est davantage la variation d'abondance d'une protéine entre plusieurs conditions qui est informative (sain vs malade, non traité vs traitement 1 vs traitement 2, etc.) que la quantité exacte. De plus, l'approche relative est compatible avec la comparaison simultanée de l'abondance d'une multitude de protéines, permettant ainsi le

suivi de plusieurs centaines ou milliers de molécules, provenant d'un ou plusieurs échantillon(s), en une seule injection dans le spectromètre de masse. A partir de ces données, des études bioinformatiques peuvent également être menées afin de détecter des dérégulations non pas à l'échelle de la simple molécule mais de la voie métabolique, du processus biologique global ou encore des interactions entre protéines (Chen et al., 2020).

La quantification absolue requiert quant à elle l'utilisation de composés « étalons » (ou « standards ») qui permettent de dresser la correspondance entre l'intensité du signal détecté en MS et une quantité de protéine donnée (Lindemann et al., 2017). En effet, chaque protéine se comporte différemment lors de la préparation de l'échantillon et répond de façon spécifique aux phénomènes physico-chimiques se déroulant lors de l'injection dans l'appareil. Il est ainsi nécessaire d'utiliser un standard, interne ou externe, de quantité connue pour au moins un peptide issu de chaque protéine étudiée : celui-ci reflètera le comportement du peptide naturel lors de la préparation de l'échantillon et de l'injection dans le spectromètre de masse. La quantification absolue apparaît donc parfaitement indiquée pour une utilisation en clinique où seulement quelques molécules d'intérêt clairement identifiées doivent être suivies (détection de biomarqueurs, détection de toxines dans le sang etc). Elle ne constitue cependant pas une méthode adaptée à l'étude simultanée de centaines voire de milliers de protéines : la diversité des peptides générés serait beaucoup trop élevée pour assurer la présence d'un étalon pour tous.

II – La protéomique de découverte et la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs

La capacité à différencier les peptides (et donc les protéines) issus de différents échantillons est le pré-requis incontournable pour toute investigation relative en MS. Pour cela, plusieurs méthodes ont été développées. Les méthodes dites sans marquage (*label-free*) ne nécessitent pas de traitement particulier des échantillons : la capacité à différencier les échantillons est assurée par l'injection en MS de chacune des conditions de façon individuelle (Fig. 1A). Le nombre de spectres MS (méthode *spectral counting*) ou l'aire sous le pic de l'ion précurseur (méthode *area under the curve*), détecté(s) pour l'ensemble des peptides d'une protéine est comparé(e) d'une condition à l'autre, permettant de conclure à l'égalité ou à la variation de l'abondance d'un composé (Anand et al., 2017). Ces approches sont peu

coûteuses, faciles à mettre en œuvre et ne nécessitent pas de traitement complexe des échantillons avant injection MS. Cependant, elles sont très demandeuses en temps-machine, ce qui est à prendre en compte dans le coût final, et le traitement parallèle ou successif de chacun des échantillons d'intérêt peut induire des biais de quantification puisque tous les signaux n'ont pas été acquis de manière simultanée et donc strictement identique. Il est alors impératif de démontrer la reproductibilité des processus de préparation d'échantillons et d'acquisition des données d'un échantillon à l'autre, mais aussi de mettre en place une méthode de normalisation des données inter-échantillons appropriée.

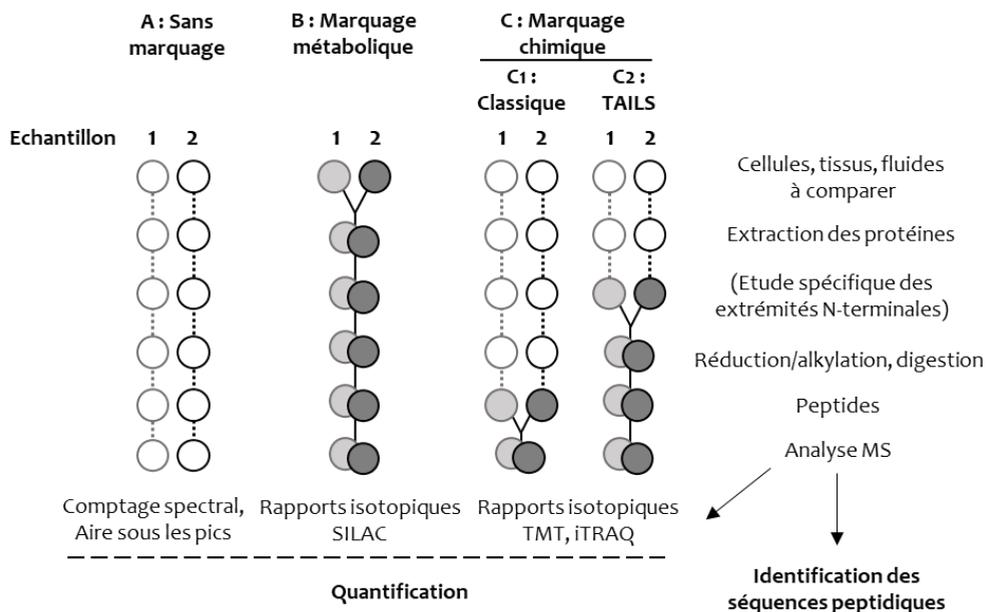


Figure 1 : Principales approches quantitatives en protéomique de découverte. Les analyses de spectrométrie de masse donnent deux informations importantes : la séquence en acides aminés et la quantité relative des peptides qui permettent de remonter, respectivement, à l'identité et à la quantité relative des protéines dans les échantillons. Pour les méthodes avec marquage, celui-ci peut être effectué dès la préparation de l'échantillon (B), au niveau des protéines extraites de l'échantillon (C2) ou au niveau des peptides issus de la digestion enzymatique (C1). Le schéma représente le cas simple de deux échantillons à comparer mais ce nombre peut être étendu sans limites pour la méthode sans marquage (A) et jusqu'au nombre maximum de réactifs isotopiques disponibles pour les autres méthodes (B-C). Les méthodes de quantification sont différentes pour chacune des approches et requièrent des logiciels d'analyse dédiés. Adapté de (Emadali and Gallagher-Gambarelli, 2009).

Pour pallier à ce biais de quantification et augmenter la reproductibilité de l'analyse MS en réalisant l'injection simultanée de plusieurs échantillons, des techniques de protéomique avec marquage, ou *label-based*, ont été développées (Rauniyar and Yates, 2014). Elles consistent en l'intégration au contenu de chaque échantillon d'un marqueur spécifique qui permettra de le différencier du contenu des autres conditions lors de l'injection commune. Les protéines provenant des différentes conditions peuvent alors être mélangées et analysées en un seul pool. Plusieurs techniques de marquage peuvent être employées. La première consiste à marquer les protéines au sein même des cellules par intégration d'un ou plusieurs atomes lourds (^{15}N , ^{13}C) aux acides aminés essentiels : on parle de « marquage métabolique » ou SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino acids in cell Culture* ; Fig. 1B). Pour chaque condition, un isotope ou une combinaison d'isotopes différent(e) est utilisé(e). Les signaux MS des peptides correspondants sont ainsi caractérisés par un gain de masse particulier propre à cette combinaison d'isotopes, donc à la condition dont ils proviennent. Il est alors possible, après mélange des peptides des différentes conditions, de quantifier l'abondance (en unités arbitraires) des peptides dans chacune d'entre elles et donc de comparer leurs teneurs entre les différents échantillons analysés. Cette approche initialement appliquée à des cellules en culture (apport des acides aminés marqués *via* le milieu) est aussi pratiquée *in vivo* aujourd'hui (apport par l'alimentation), le plus souvent pour des études courtes d'identification des protéines induites sous l'action d'un stimulus (Zanivan et al., 2012). Si le mélange des échantillons à une étape très précoce de leur préparation limite les sources de biais expérimentaux, de telles méthodes sont limitées par leur coût, un multiplexage de conditions limité et une durée de mise en œuvre souvent conséquente (temps nécessaire à l'intégration des acides aminés marqués à la totalité des protéines). Par ailleurs, elles ne sont pas applicables pour les études sur des sujets humains.

Afin d'augmenter la capacité de multiplexage ainsi que la diversité des échantillons analysables et de diminuer le temps d'expérimentation, les « marquages chimiques » (principalement à l'aide des réactifs commerciaux TMT™ et iTRAQ®), réalisés après digestion enzymatique (Fig. 1C1), ont été développés. Pour chaque échantillon, une étiquette (*tag*) unique de masse connue (marquée par une combinaison d'isotopes stables) est choisie et ajoutée de façon covalente à tous les peptides de l'échantillon. Dans le mélange analysé en MS, un peptide retrouvé dans plusieurs conditions est donc détecté sous plusieurs formes, chacune correspondant à la présence d'un

tag différent. La quantification relative est alors possible, de manière similaire au marquage métabolique. De telles approches peuvent cependant demander une optimisation de la réaction de marquage et nécessitent un traitement individuel des échantillons jusqu'à l'étape de marquage, pouvant conduire à une quantification légèrement moins fiable qu'avec le marquage métabolique.

Les méthodes de spectrométrie de masse quantitative relative ont à ce jour permis de comparer des protéomes très divers et de caractériser de multiples dérégulations pathologiques, en seulement quelques analyses. Récemment, le protéome de la peau humaine et ses variations en termes de qualité et de quantité (évaluée par la méthode sans marquage), d'un compartiment à l'autre (épiderme supérieur, épiderme inférieur, derme et hypoderme) mais aussi d'un type cellulaire à l'autre (kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, mélanocytes, mastocytes, macrophages, cellules dendritiques), ont été décrits (Dyring-Andersen et al., 2020). Cette étude décrit donc le premier « atlas » de la composition de la peau normale au niveau des protéines et met en évidence des biomarqueurs spécifiques de chaque compartiment ou type cellulaire. De nombreuses autres études protéomiques ont également contribué à mettre en évidence une modification de l'abondance de certains composants dans les pathologies cutanées et permis de révéler des voies de biosynthèse et de signalisation ainsi que différents processus cellulaires particulièrement altérés dans ces maladies. Des revues récentes font par exemple le point sur les analyses protéomiques réalisées dans le cadre de l'étude du psoriasis (Chularojanamontri et al., 2019), du mélanome (Donnelly et al., 2019) ou de l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (Dengjel et al., 2020). Notons également que des optimisations ont été réalisées pour permettre l'étude protéomique quantitative des couches superficielles de l'épiderme (*stratum corneum*) par des méthodes peu invasives telles que les prélèvements sur rubans adhésifs (Kaleja et al., 2020).

Par ailleurs, de nouvelles approches ont été développées pour étudier spécifiquement certains sous-protéomes cutanés. En particulier, la peau étant un tissu riche en matrice extracellulaire, de nombreuses pathologies cutanées ont des répercussions sur la composition de ce compartiment tissulaire (cicatrices hypertrophiques, chéloïdes, sclérodermie, épidermolyse bulleuse etc). Cependant, les protéines matricielles sont porteuses de nombreuses modifications post-traductionnelles et largement insolubles, ce qui rend leur détection en MS particulièrement difficile. Pour remédier à ce problème, il peut être nécessaire d'utiliser des protocoles de préparation d'échantillons et

de post-traitement des données MS favorisant leur enrichissement et leur détection. Une étude récente a montré que les approches de décellularisation et de solubilisation progressive par des détergents permettent une meilleure couverture du « matrisome », particulièrement complexe de la peau, que les méthodes de lyse classiques (Dussoyer et al., 2022). Ces méthodes d'enrichissement ont par ailleurs fait leurs preuves pour l'étude de la matrice extracellulaire aberrante qui est déposée dans les cicatrices chéloïdes (Barallobre-Barreiro et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Une autre approche intéressante, possible seulement en protéomique et pas avec les autres méthodes omiques, consiste à caractériser les altérations quantitatives des modifications post-traductionnelles observées sur les protéines suite à une perturbation de l'homéostasie. La disparition de certains peptides peut en effet révéler l'ajout anormal d'une modification sur ces peptides. Cette approche appelée *Peptide Location Fingerprint* a ainsi été appliquée avec succès à la comparaison de peaux âgées par le vieillissement naturel ou l'exposition aux UV et a permis l'identification de 120 biomarqueurs candidats dans le derme et 70 dans l'épiderme (Ozols et al., 2021). Par ailleurs, certaines modifications post-traductionnelles spécifiques se prêtent particulièrement bien à l'analyse protéomique. C'est le cas de la protéolyse qui est un reflet très pertinent des processus dynamiques en cours dans un tissu. Ainsi, les fragments générés par l'activité des protéases au sein d'un échantillon représentent des sources potentielles de biomarqueurs du remodelage tissulaire. Ces approches sont regroupées sous le nom de N-terminomique car elles sont centrées sur la détection des peptides N-terminaux des protéines et de leurs fragments protéolytiques. Une des techniques de N-terminomique appelée TAILS (*Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates* ; Fig. 1C2) a ainsi permis de caractériser de nouveaux processus de maturation des précurseurs des collagènes fibrillaires dans le derme (Leduc et al., 2021), de révéler une augmentation globale de la protéolyse en cas d'inflammation de la peau (auf dem Keller et al., 2013) ou encore d'identifier des processus de dégradation anormaux dans le contexte des plaies chroniques (Sabino et al., 2018).

Les résultats de ces criblages du protéome à grande échelle, permis par la quantification relative, peuvent ensuite être utilisés comme base pour la validation ou le suivi de biomarqueurs spécifiques en donnant des informations préliminaires sur les peptides susceptibles d'être détectés en protéomique ciblée.

III – La protéomique ciblée et le suivi des biomarqueurs

Les approches quantitatives globales, comme nous venons de le voir, servent de phase exploratoire pour identifier des biomarqueurs. Pour valider ces biomarqueurs protéiques mais également les utiliser en clinique pour diagnostiquer ou suivre une pathologie, il est courant d'utiliser l'ELISA. Cependant, cette méthode est limitée car elle repose sur le suivi d'un biomarqueur unique et nécessite le développement d'anticorps sensibles, spécifiques et reconnaissant la forme native de la protéine. Grâce aux progrès technologiques instrumentaux réalisés ces dernières années, plusieurs approches, également basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse, ont été développées. Elles permettent de suivre et de quantifier plusieurs protéines simultanément avec une sensibilité équivalente à l'ELISA et une très bonne spécificité.

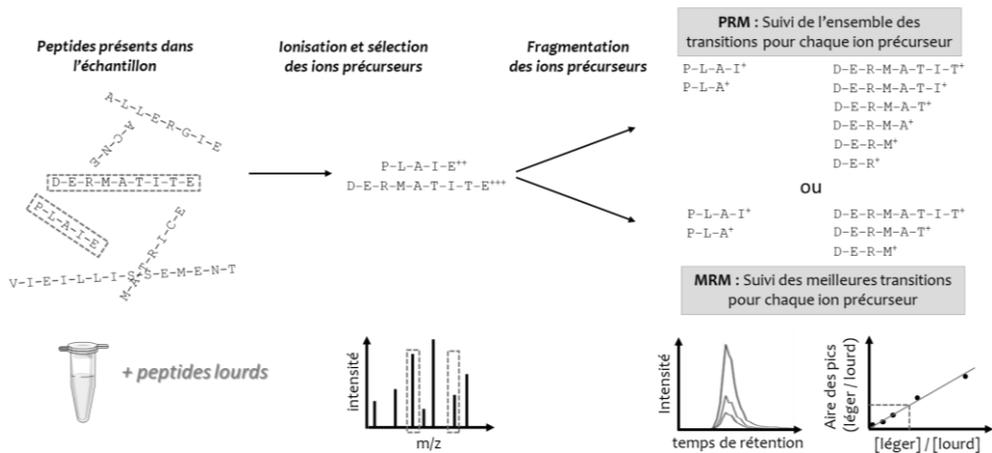


Figure 2 : Principe des méthodes de protéomique ciblée PRM et MRM pour la quantification absolue. Après sélection et fragmentation des ions précurseurs choisis pour la détection de la protéine d'intérêt, la quantification peut être réalisée par comparaison avec le signal des peptides synthétiques correspondants, marqués avec des isotopes et ajoutés en quantité connue dans l'échantillon de départ.

La protéomique ciblée couvre les approches de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), de PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) mais également l'utilisation de données acquises en DIA (*Data Independent Acquisition*) pour quantifier des bibliothèques de peptide. Cette dernière approche ne sera pas détaillée ici car encore peu utilisée mais son intérêt pour l'identification de

biomarqueurs est décrit dans plusieurs revues (par exemple (Sajic et al., 2015)). Les approches ciblées reposent sur le suivi exclusif de peptides spécifiques appartenant à une ou plusieurs protéines (par opposition à la spectrométrie de masse décrite ci-dessus où une sélection est également réalisée mais sur la base de l'intensité des peptides et non sur la base de la protéine à laquelle ils appartiennent). Chaque protéine est détectée à partir d'un nombre limité de peptides uniques, issus du traitement de l'échantillon par des protéases telles que la trypsine (peptides protéotypiques). Ces peptides protéotypiques ou « ions précurseurs » sont ensuite fragmentés dans le spectromètre de masse et les signaux générés par ces fragments sont appelés « transitions ». Pour chaque peptide, plusieurs transitions sont suivies, et de même, pour chaque protéine, plusieurs peptides protéotypiques ou précurseurs peuvent être suivis (Fig. 2). Cette double sélection (précurseur et transitions) assure la spécificité de la méthode. La PRM et la MRM sont basées sur le même principe, toutefois la PRM utilise un spectromètre Quadripôle-Orbitrap haute résolution sans sélection préalable des transitions tandis que la MRM repose sur l'utilisation d'un spectromètre du type triple quadripôle avec sélection préalable des transitions. La MRM et la PRM, en plus d'être extrêmement sensibles et spécifiques, sont les seules méthodes de spectrométrie de masse qui permettent la mesure de la quantité absolue d'une protéine cible dans un échantillon, grâce à l'ajout d'un étalon interne (peptides synthétiques marqués par des isotopes stables) (Fig. 2). C'est pourquoi ces approches sont de plus en plus envisagées dans le contexte clinique pour valider des candidats biomarqueurs, diagnostiquer une maladie ou suivre l'effet d'un traitement thérapeutique.

Dans le cadre des maladies de la peau, la PRM a été utilisée récemment pour valider la différence d'expression de protéines chez des patients souffrant de *Psoriasis vulgaris*. Après l'identification par la méthode de marquage au TMTTM de plusieurs cibles potentielles, des biopsies de patients sains et atteints de *Psoriasis vulgaris* ont été analysées par PRM. Au total, cinq protéines dont la quantité est significativement plus élevée, et quatre dont la quantité est significativement plus faible, ont été retrouvées chez les patients atteints de *Psoriasis vulgaris* (Li et al., 2020). Bien que cette première étude soit encourageante, il reste encore à valider ces biomarqueurs potentiels sur une cohorte de patients plus importante et à réaliser des quantifications absolues. D'autre part, plusieurs autres travaux ont caractérisé le profil protéomique du sérum de patients atteints de dermatite atopique, de dermatite de contact ou de psoriasis. Si ces pathologies de la peau partagent des

dérégulations communes, il est toutefois possible d'identifier des signatures protéomiques propres à chacune d'elles (Brunner et al., 2017; Pavel et al., 2020). Grâce à ces données, il serait envisageable de développer un essai utilisant la protéomique ciblée pour suivre et quantifier plusieurs biomarqueurs spécifiques de chacune de ces pathologies afin de les diagnostiquer au mieux mais également de prédire le traitement préférentiel pour chaque patient. Un autre exemple de l'utilisation de la protéomique ciblée dans l'étude des biomarqueurs cutanés concerne les plaies chroniques. Les études effectuées par Sabino *et al.* sur un modèle porcin de cicatrisation ont permis d'identifier l'augmentation de l'abondance relative des protéines zyxine et HtrA1 comme biomarqueurs de la fermeture favorable des plaies (Sabino et al., 2018). Par la suite, une étude en PRM d'exsudats de plaies issus d'une petite cohorte de patients a permis de valider qu'un retard dans l'augmentation de l'abondance de ces protéines était caractéristique des plaies à cicatrisation lente (Sabino et al., 2018).

En résumé, la protéomique ciblée offre la possibilité de suivre plusieurs protéines dans une même analyse (multiplexage) et de les quantifier dans divers types de milieux complexes (biopsies de peau, exsudats de plaie, plasma/sérum).

IV – Conclusion

Nous avons vu que la protéomique offre de multiples possibilités pour identifier et quantifier des biomarqueurs de pathologies cutanées. Si la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs est maintenant relativement bien couverte par les laboratoires académiques, l'enjeu actuel consiste à sélectionner les biomarqueurs les plus pertinents et à les valider sur de plus grandes cohortes de patients. Ceci nécessitera l'intégration des méthodes de protéomique ciblée dans le milieu hospitalier. Même si cette transition est lente du fait du coût des équipements et du haut degré de technicité requise, elle a déjà commencé, comme en témoigne le projet idBIORIV, coordonné par les hospices civils de Lyon (2019-2024 ; <https://idbioriv.com>), visant à développer une méthode MRM de diagnostic du sepsis en moins d'une heure. On peut donc envisager son déploiement à plus grande échelle dans un futur proche, y compris pour des applications de dermatologie. Comme nous l'avons vu au travers des exemples donnés ci-dessus, la protéomique ciblée

pourrait aider à distinguer rapidement plusieurs formes proches d'affections cutanées et donc à mieux adapter le traitement, à prédire quels patients sont plus susceptibles de présenter un retard de cicatrisation après une plaie ou encore à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet thérapeutique d'un candidat médicament lors d'un essai clinique.

Bibliographie

- Anand, S., M. Samuel, C.S. Ang, S. Keerthikumar, and S. Mathivanan. 2017. Label-based and label-free strategies for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1549:31-43.
- auf dem Keller, U., A. Prudova, U. Eckhard, B. Fingleton, and C.M. Overall. 2013. Systems-level analysis of proteolytic events in increased vascular permeability and complement activation in skin inflammation. *Sci Signal.* 6:rs2.
- Barallobre-Barreiro, J., E. Woods, R.E. Bell, J.A. Easton, C. Hobbs, M. Eager, F. Baig, A.M. Ross, R. Mallipeddi, B. Powell, M. Soldin, M. Mayr, and T.J. Shaw. 2019. Cartilage-like composition of keloid scar extracellular matrix suggests fibroblast mis-differentiation in disease. *Matrix Biol Plus.* 4:100016.
- Brunner, P.M., M. Suarez-Farinas, H. He, K. Malik, H.C. Wen, J. Gonzalez, T.C. Chan, Y. Estrada, X. Zheng, S. Khattri, A. Dattola, J.G. Krueger, and E. Guttman-Yassky. 2017. The atopic dermatitis blood signature is characterized by increases in inflammatory and cardiovascular risk proteins. *Sci Rep.* 7:8707.
- Chen, C., J. Hou, J.J. Tanner, and J. Cheng. 2020. Bioinformatics Methods for Mass Spectrometry-Based Proteomics Data Analysis. *Int J Mol Sci.* 21:2873.
- Chularojanamontri, L., N. Charoenpipatsin, N. Silpa-Archa, C. Wongpraparut, and V. Thongboonkerd. 2019. Proteomics in Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 20:1141.
- Dengjel, J., L. Bruckner-Tuderman, and A. Nystrom. 2020. Skin proteomics - analysis of the extracellular matrix in health and disease. *Expert Rev Proteomics.* 17:377-391.
- Donnelly, D., 3rd, P.P. Aung, and G. Jour. 2019. The "-OMICS" facet of melanoma: Heterogeneity of genomic, proteomic and metabolomic biomarkers. *Semin Cancer Biol.* 59:165-174.

- Dussoyer, M., A. Page, F. Delolme, P. Rousselle, A. Nystrom, and C. Moali. 2022. Comparison of extracellular matrix enrichment protocols for the improved characterization of the skin matrisome by mass spectrometry. *J Proteomics*. 251:104397.
- Dyring-Andersen, B., M.B. Lovendorf, F. Coscia, A. Santos, L.B.P. Moller, A.R. Colaco, L. Niu, M. Bzorek, S. Doll, J.L. Andersen, R.A. Clark, L. Skov, M.B.M. Teunissen, and M. Mann. 2020. Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin. *Nat Commun*. 11:5587.
- Emadali, A., and M. Gallagher-Gambarelli. 2009. [Quantitative proteomics by SILAC: practicalities and perspectives for an evolving approach]. *Med Sci (Paris)*. 25:835-842.
- Kaleja, P., H. Emmert, U. Gerstel, S. Weidinger, and A. Tholey. 2020. Evaluation and improvement of protein extraction methods for analysis of skin proteome by noninvasive tape stripping. *J Proteomics*. 217:103678.
- Leduc, C., L. Dupont, L. Joannes, C. Monseur, D. Baiwir, G. Mazzucchelli, C. Deroanne, A. Colige, and M. Bekhouche. 2021. In vivo N-terminomics highlights novel functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 in skin collagen matrix building. *Front Mol Biosci*. 8:643178.
- Li, Y., P. Lin, S. Wang, S. Li, R. Wang, L. Yang, and H. Wang. 2020. Quantitative analysis of differentially expressed proteins in psoriasis vulgaris using tandem mass tags and parallel reaction monitoring. *Clin Proteomics*. 17:30.
- Lindemann, C., N. Thomanek, F. Hundt, T. Lerari, H.E. Meyer, D. Wolters, and K. Marcus. 2017. Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. *Biol Chem*. 398:687-699.
- Ozols, M., A. Eckersley, K.T. Mellody, V. Mallikarjun, S. Warwood, R. O'Cualain, D. Knight, R.E.B. Watson, C.E.M. Griffiths, J. Swift, and M.J. Sherratt. 2021. Peptide location fingerprinting reveals modification-associated biomarker candidates of ageing in human tissue proteomes. *Ageing Cell*. 20:e13355.
- Pavel, A.B., L. Zhou, A. Diaz, B. Ungar, J. Dan, H. He, Y.D. Estrada, H. Xu, M. Fernandes, Y. Renert-Yuval, J.G. Krueger, and E. Guttman-Yassky. 2020. The proteomic skin profile of moderate-to-severe atopic dermatitis patients shows an inflammatory signature. *J Am Acad Dermatol*. 82:690-699.

- Rauniyar, N., and J.R. Yates, 3rd. 2014. Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. *J Proteome Res.* 13:5293-5309.
- Sabino, F., F.E. Egli, S. Savickas, J. Holstein, D. Kaspar, M. Rollmann, J.N. Kizhakkedathu, T. Pohlemann, H. Smola, and U. Auf dem Keller. 2018. Comparative degradomics of porcine and human wound exudates unravels biomarker candidates for assessment of wound healing progression in trauma patients. *J Invest Dermatol.* 138:413-422.
- Sajic, T., Y. Liu, and R. Aebersold. 2015. Using data-independent, high-resolution mass spectrometry in protein biomarker research: perspectives and clinical applications. *Proteomics Clin Appl.* 9:307-321.
- Zanivan, S., M. Krueger, and M. Mann. 2012. In vivo quantitative proteomics: the SILAC mouse. *Methods Mol Biol.* 757:435-450.
- Zhang, S., B. Liu, W. Wang, L. Lv, D. Gao, M. Chai, M. Li, Z. Wu, Y. Zhu, J. Ma, and L. Leng. 2021. The "Matrisome" reveals the characterization of skin keloid microenvironment. *FASEB J.* 35:e21237.