

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE-UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DE LILLE (FRANCE)
UNIVERSITE DE SHERBROOKE (CANADA)

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences
de l'Université des Sciences et Technologies de Lille et de l'Université de Sherbrooke

Présentée par

Rémi Longuespée

**Histologie moléculaire: développements et applications pour la recherche de
biomarqueurs du cancer de l'ovaire**

Doctorat sous la cotutelle internationale du Pr. Michel Salzet et du Pr. Robert Day

Soutenue à Villeneuve d'Ascq, le 28 septembre 2012

Devant le jury composé de :

Pr. Isabelle Fournier	Présidente
Pr. Michel Salzet	Co-directeur de Thèse
Pr. Robert Day	Co-directeur de Thèse
Dr. Philippe Bulet	Rapporteur
Dr. Alain Brunelle	Rapporteur
Pr. Xavier Roucou	Examineur
Dr. Christian Larroque	Examineur
Dr. Eric Leblanc	Invité

Remerciements

L'ensemble de ces travaux n'aurait pas été réalisable sans les personnes, collègues ou proches avec qui j'ai pu interagir depuis ces trois dernières années.

J'ai eu l'immense honneur de vivre l'expérience extrêmement enrichissante du doctorat en cotutelle internationale entre l'université française de Lille 1 et l'université québécoise de Sherbrooke. A ce titre, je tiens tout particulièrement à remercier mes deux codirecteurs de doctorat Michel Salzet en France et Robert Day au Québec. Je leur exprime toute mon estime et ma reconnaissance pour la confiance qu'ils m'ont accordé tout au long des ces années, ainsi que pour la formation de qualité qu'ils m'ont apporté. Je remercie également le professeur Isabelle Fournier, responsable de l'équipe d'imagerie MALDI pour son aide et la qualité de ces enseignements.

Je remercie mes deux rapporteurs, Philippe Bulet du Biopark d'Archamps les Genève et Alain Brunelle de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également les autres membres du jury Xavier Roucou, Christian Larroque, et Eric Leblanc de me faire l'honneur d'assister à la soutenance et de participer aux discussions.

Je tiens à remercier les membres actuels ou anciens de mon laboratoire d'accueil en France : Jusal, Julien, Maxence, Céline, Laurent, David, Karim, Mohamed, Benjamin, Thomas, Céline, Charlotte, Adesuwa, Olivia avec qui j'ai partagé cette aventure. De même, je remercie les membres de mon laboratoire d'accueil au Québec : Roxane, Sophie, Sandra, Hugo, Anna, Sarah, Kevin, Christine, Frédéric, Philippe, Frédéric, Sophie et Xue Wen pour leur aide et leur sens de l'hospitalité.

Je tiens à remercier tous les collaborateurs de ce projet avec qui j'ai pu interagir, Denis Vinatier pour les tissus qu'il nous a permis de nous procurer, Eric Leblanc pour le partage de sa vision et de ses perspectives pour la prise en charge médicale. Olivier Kerdraon pour la mine d'information qu'il a pu me procurer dans le domaine de l'anatomopathologie ainsi que

pour les tissus FFPE qu'il nous a méticuleusement sélectionnés, Christophe Tastet pour ses enseignements de grande qualité et son aide généreuse pour la réalisation des gels bidimensionnels.

Enfin, je remercie Annie, technicienne de l'équipe d'imagerie MALDI pour son aide précieuse, sa gentillesse et sa générosité sans limites.

Je remercie les membres du jury de mon examen prédoctoral pour avoir évalué et discuté mon travail : les professeurs Claude Lazure, Xavier Roucou, et Eric Massé.

Je remercie ma famille, mes parents Dominique et Emile, mon frère Alexis, mon oncle Luc et ma tante Marielle. Je remercie également mes proches ami(e)s en France: Adrien, Quentin, Ludo, Maximilien, Clotilde, Pierre, Marine, Anouk, Mo, Hugo, Yoan, Romuald, Florian, Florent, Julien, Mélanie, Karim, Richard, Nicolas, Karim, Raphael, et au Québec : Stéphanie, Antoine, Christine, Marc, Dave, Walid, Alex, Céline, Marc, Heidi, Felix, Lena, Nicolas, Eloïc, Thomas, William, Hugo, Elie.

Leur soutien a été d'une extrême importance ces dernières années.

Enfin je remercie Marjorie, pour l'affection et le soutien qu'elle m'a apporté, et pour la patience et la compréhension dont elle a fait preuve au cours de cette expérience du doctorat.

Résumé

La technique d'analyse par spectrométrie de masse (MS) MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) sur tissus a été introduite à la fin des années 1990. Elle a depuis connu un essor de développements pour qu'aujourd'hui elle soit considérée comme une méthode de choix pour la recherche de biomarqueurs de pathologies dans un contexte anatomique. Cependant, la méthodologie connaissait certains aléas liés à la nature de l'échantillon. Le premier but du doctorat a été de développer des procédures afin de repousser les limites de détection des protéines sur tissus. Ces approches, qui nous ont permis de mieux extraire des composés du tissu pour des analyses directes ont alors pu être mises en application avec d'autres méthodes de protéomiques comme l'électrophorèse bidimensionnelle pour l'identification parallèle des composés. La suite des travaux consista au développement d'outils plus spécifiques pour la recherche de biomarqueurs via les analyses sur coupes de tissus. Les analyses PCA ont tout d'abord été mise au point pour des approches de type bottom up ou top down sur des biopsies de cancer de la prostate, qui nous a servi de modèle.

Les étapes suivantes ont alors été l'application des différents outils développés à la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire. Différents objectifs ont alors été ciblés pour permettre le criblage des biomarqueurs sur de larges cohortes de tissus, l'identification parallèle de ces biomarqueurs par des approches bottom up et la validation de certains de ceux ci par méthodes classique de biochimie comme le western blot mais aussi par profiling ou imagerie MALDI. Grâce à l'utilisation de méthodes classiques d'immunohistochimie et de méthodes nouvellement développées d'extraction de protéines sur coupes de tissu, il a été possible de déterminer que le fragment C-terminal de Reg-Alpha, la sous unité 11S de l'activateur de l'immunoprotéasome, avait une forte prévalence dans une large gamme de tissus de cancer de l'ovaire.

L'utilisation des analyses sur tissu nous a également permis d'explorer une problématique de haute importance en clinique, la détermination de l'origine histologique du cancer de l'ovaire. Les cancers de l'ovaire épithéliaux ont une similitude avec d'autres types de tissus mullériens et selon une théorie récemment avancée, auraient une origine associée à ces tissus. La préservation du contexte anatomique des composés analysés nous a alors permis de comparer la composition moléculaire de différents types tissulaires de patientes

sélectionnées. Des analyses en composante principale (PCA) ont été réalisées dans un premier temps pour comparer la nature moléculaire des tissus dans une représentation bidimensionnelle. Des analyses protéomiques nous ont ensuite conduit à déterminer les acteurs protéiques qui pourraient être mis en jeu dans les mécanismes communs de cancérisation entre le plus prévalent des cancers de l'ovaire épithéliaux, le cancer séreux, et son potentiel tissu d'origine, le tissu tubaire. Il est alors apparu que la sous régulation des certaines protéines, comme celles de la défense immunitaire ou de l'adhésion cellulaire à la matrice extra cellulaire, pourrait être à l'origine du développement de cellules cancéreuses tubaire dans l'environnement ovarien. L'approche d'analyses de protéines de régions histologiques d'intérêts nous a également permis d'obtenir une liste de marqueurs très spécifiques de chaque type de cancer, dont certains constituent une nouvelle preuve de la possible étiologie tubaire du cancer de l'ovaire séreux. Cette approche nous a également permis de prouver la grande pertinence des analyses respectant le contexte anatomique de l'échantillon.

Le dernier objectif de ce doctorat a été la détermination de l'implication des proprotéines convertases dans le contexte du cancer de l'ovaire. Ces enzymes jouent un rôle important dans la maturation de substrats qui ont une action promotrice de la cancérisation et de la métastase. L'objectif a alors été de déterminer la redondance fonctionnelle de ces enzymes dans des modèles cellulaires knock down (KD) pour chacun des membres de cette famille. Divers test, de prolifération, de clonogenicité et de croissance in vivo ont mis en évidence la haute importance de PACE4 dans les diverses caractéristiques de la lignée cellulaire SKOV-3.

Dans l'ensemble de ces travaux, nous avons exploré un peu plus en profondeur les acteurs de la cancérisation de l'ovaire. De nouvelles approches pour des investigations en clinique ont été abordées et ont conduit à la découverte de biomarqueurs très spécifiques du cancer de l'ovaire épithélial.

Abstract

On-tissue MALDI mass spectrometry analysis technique has been introduced at the end of the 90's and has widely been developed until the point that it's now considered as a method of choice for biomarker research of pathologies in an anatomical context. Therefore, some issues remained, linked to the nature of the sample. The first goal of this PhD has been to develop procedures which allowed us to push back the limits of detection of proteins on the tissue. With these approaches, we better extracted compounds on the tissue sections for direct MALDI analyses and we combined these approaches with other proteomic methods such as bidimensional electropheris for the parallel identification of the biomarkers. The next aims consisted in the development of more specific tools for biomarker research using analyses on tissue sections. Principal Component Analyses (PCA) have first been tuned for bottom up or top down approaches on prostate cancer biopsies.

The next steps were the application of the different developed tools to ovarian cancer biomarker research. Different goals were then settled for the screening of biomarkers on large cohorts of tissues, the parallel identification of these biomarkers using bottom up approaches and their validation by classical biochemistry methods such as western blot and also by MALDI MS profiling or imaging. Thanks to the use of classical immunohistochemistry approaches and newly developed methods for protein extraction on tissue sections, we have been able to determine that the Cterminal fragment of Reg-Alpha, the 11S immunoproteasome activator subunit had a great prevalence for a large range of ovarian cancer tissues.

The use of on-tissues analyses also allowed us to explore a high clinical impact issue, which is the determination of the histological origin of ovarian cancer. These cancers have similarities with other mullerian tissue types and, according to a recently stated theory, would derive from these tissues. Anatomical context preservation of analysed compounds allowed us to compare the molecular composition of different tissue types of selected patients. PCA were first used to compare the molecular nature of the tissues by a bidimensionnal representation.

Proteomics analyses then allowed us to determine the molecular actors that could be involved in common mechanisms of cancerization between the most prevalent of epithelial ovarian cancers, namely serous ovarian cancer and its potential tissue of origin, the tubal one.

We showed that the down regulation of some proteins such as innate immunity proteins or proteins for cell adhesion to the extra cellular matrix would cause the nesting of tubal cells in the ovarian environment. The approach of analyses of regions of interest also allowed us to obtain a list of highly specific biomarkers for each type of cancer, in which some of these brought a new evidence of the probable tubal etiology of ovarian cancer. This approach also allowed us to prove the high relevance of analyses regarding the anatomical context of the sample.

The last aim of this thesis has been the determination of proprotein convertases involvement in ovarian cancer context. These enzymes play a critical role in the processing of substrates that promotes cancerization. The goal was then to determine the functional redundancy of these enzymes in Knock Down models for each member of this enzyme family. Diverse tests, such as proliferation, clonogenicity and xenografts highlighted PACE4 importance in few cancerous aspects of SKOV-3 cell lines.

This works allowed us to deeply explore the molecular actors of ovarian cancerization. New approaches for clinical investigations have been tackled and lead to the discovery of highly specific epithelial ovarian cancer biomarkers.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	6
Abstract	8
Publications et communications.....	13
Publications	13
En ligne sur Pubmed	13
En soumission dans Proteomics, clinical application.....	14
Chapitre de livre	14
Brevets.....	15
Communications.....	16
Communications orales	16
Affiches	17
Liste des figures et tableaux	19
Listes des abréviations	25
Chapitre 1 : Introduction	29
Chapitre 2 : Le cancer de l’ovaire, état de l’art de la recherche de biomarqueurs	36
2.1. Le cancer de l’ovaire, un « tueur silencieux ».....	37
2.1.1. Le dépistage du cancer de l’ovaire	38
2.1.2. Les biomarqueurs du cancer de l’ovaire	39
2.2. La protéomique au service de la recherche de biomarqueurs des cancers de l’ovaire épithéliaux	45
2.2.1. Les méthodes en gel	47
2.2.2. Les méthodes basées sur la spectrométrie de masse	48
2.2.3. L’analyse par spectrométrie de masse directe sur tissu.....	55
	10

2.3. Les proprotéines convertases	89
2.3.1. Nature des proprotéines convertases	89
2.3.2. Implication des PC dans la progression tumorale et la malignité	91
Chapitre 3 : Résultats	99
Partie 1 : Développement de méthodes pour l'extraction de protéines de hautes masses moléculaires sur tissu	100
3.1. 1. Extraction des protéines des hautes masses moléculaires sur coupe	104
3.1.2. Combinaison du profilage de protéines de hautes masses moléculaires sur coupes de tissus avec l'approche d'électrophorèse bidimensionnelle pour l'identification	117
3.1.3. Imagerie des protéines de hautes masses moléculaires	123
Partie 2 : Des développements des outils analytiques à la validation de biomarqueurs du cancer de l'ovaire	127
3.2.1. Développement d'outils statistiques pour l'analyse en bottom-up et top down des images MALDI	130
3.2.2. Recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire : application des développements d'extraction des protéines et des outils statistiques	137
3.2.3. Analyse ciblée de biomarqueurs du cancer de l'ovaire : exemple d'antigen retrieval pour la détection du fragment C-terminal de Reg-alpha	145
3.2.4. Perspectives	155
3.2.5. Détermination de l'origine du cancer sur la base de profils moléculaires	158
Partie 3 : Détermination de l'implication des proprotéines convertases dans le cancer de l'ovaire	177
3.3.1. Stratégie d'investigation	178
3.3.2. Détermination de l'expression des PC dans le modèle cellulaire SKOV-3	179
3.3.3. Knock Down des PC dans les cellules SKOV3	180
3.3.4. Perspectives	193
Conclusion générale et perspectives	197
Annexes	220

Article 1.....	221
Article 2.....	229
Article 3.....	238
Article 4.....	252
Article 5.....	271
Article 6.....	286
Article 7.....	321

Publications et communications

Publications

En ligne sur Pubmed

Ovarian cancer molecular pathology.

Longuespée R, Boyon C, Desmons A, Vinatier D, Leblanc E, Farré I, Wisztorski M, Ly K, D'Anjou F, Day R, Fournier I, Salzet M.

Cancer Metastasis Rev. 2012 Jun 23.

PMID: 22729278

The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling.

Longuespée R, Boyon C, Castellier C, Jacquet A, Desmons A, Kerdraon O, Vinatier D, Fournier I, Day R, Salzet M.

Histochem Cell Biol. 2012 Jul;138(1):141-54. Epub 2012 Apr 25.

PMID: 22532226

Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer.

Bonnel D, Longuespée R, Franck J, Roudbaraki M, Gosset P, Day R, Salzet M, Fournier I.

Anal Bioanal Chem. 2011 Jul;401(1):149-65. Epub 2011 Apr 26.

PMID: 21519967

MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue.

van Remoortere A, van Zeijl RJ, van den Oever N, Franck J, Longuespée R, Wisztorski M, Salzet M, Deelder AM, Fournier I, McDonnell LA.

J Am Soc Mass Spectrom. 2010 Nov;21(11):1922-9. Epub 2010 Aug 4.

PMID: 20829063

MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons.

Longuespée R, Franck J, , Wisztorski M, Van Remoortere A, Van Zeijl R, Deelder A, Salzet M, McDonnell L, Fournier I.

Med Sci Monit. 2010 Sep;16(9):BR293-9.

PMID: 20802405

MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers.

El Ayed M, Bonnel D, Longuespée R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M.

Med Sci Monit. 2010 Aug;16(8):BR233-45.

PMID: 20671603

En soumission dans Proteomics, clinical application

Proteomic analyses of serous and endometrioid epithelial ovarian cancers: molecular insights of a possible histological etiology

Rémi Longuespée, Hugo Gagnon, Charlotte Boyon, Kurstin Strupat, Claire Daully, Olivier Kerdraon, Adesuwa Ighodaro, Annie Desmons, Jocelyn Dupuis, Maxence Wisztorski, Denis Vinatier, Isabelle Fournier, Robert Day, Michel Salzet.

Chapitre de livre

Longuespée R, Boyon C, Kerdraon O, Desmons A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M

MALDI Imaging Mass Spectrometry In Cancer

Intech. Cancer treatment, Book 4

Brevets

2009 : Enveloppe soleau, Institut National de la Propriété Industrielle n° 357757 290709 :

Rémi Longuespée, Julien Franck, Michel Salzet et Isabelle Fournier, Développement de nouveaux procédés en vue de l'obtention d'images moléculaires de protéines de hautes masses par spectrométrie de masse à partir de tissus

Franck J., Longuespée R., Fournier I., Salzet M.

Développement de nouveaux procédés en vue de l'obtention d'images moléculaires de protéines de hautes masses par spectrométrie de masse à partir de tissus. EP2317323.

Communications

Communications orales

1. 53rd Symposium of the society for Histochemistry (SFH) Octobre 2011, Munich, ALLEMAGNE: gagnant du “Travel award for young histochemists” (300 euros)

R. Longuespée, C. Boyon, O. Kerdraon, A. Desmons, D. Vinatier, R. Day, I. Fournier, M. Salzet
MALDI MSI for ovarian cancer biomarkers research: latest developments of the technology for screening and tracking.

2. HUPO septembre 2011, Genève, SUISSE: Finaliste du “EUPA Young Investigators in Proteomics Awards”

R. Longuespée, C. Boyon, O. Kerdraon, A. Desmons, D. Vinatier, R. Day, I. Fournier, M. Salzet
MALDI MSI for the screening of ovarian cancer biomarkers: new insight of the technology for new issues in pharmacology.

3. European Symposium of Ovarian Cancer (ESOC) Juin 2011, Reims, FRANCE

R. Longuespée, C. Boyon, O. Kerdraon, A. Desmons, D. Vinatier, R. Day, I. Fournier, M. Salzet
Tissue proteomics of ovarian epithelial cancers.

4. 2nd International Workshop on Protein Analysis of Tissues, Février 2011, Munich ALLEMAGNE

Rémi Longuespée, Charlotte Boyon, Denis Vinatier, Jean-Philippe Lucot, Michel Salzet, Isabelle Fournier
MALDI Imaging Mass Spectrometry for Studying Cancer Diseases.

Affiches

1. Spectrométrie de Masse et Analyses Protéomiques (SMAP) Septembre 2011, Avignon, FRANCE

R.Longuespée, C.Boyon, O.Kerdraon, A.desmons, D.Vinatier, R.Day, I.Fournier, M.Salzet
Molecular histology for epithelial ovarian cancers biomarker hunting: new issues for biology and pharmacology.

2. European Society for Gynecological Oncology (ESGO) Septembre 2011, Milan, ITALIE: 2 affiches (article dans la revue « Journal International de Médecine »)

R.Longuespée, C.Boyon, O.Kerdraon, A.desmons, D.Vinatier, R.Day, I.Fournier, M.Salzet
Tissue Proteomics of Epithelial Ovarian Cancers.

C.Boyon, R.Longuespée, O.Kerdraon, A.desmons, D.Vinatier, R.Day, I.Fournier, M.Salzet
MALDI Mass Spectrometry Imaging for the Screening of Epithelial Ovarian Cancer Biomarkers.

3. European Molecular Biology Organization (EMBO) Juin 2011 Cancer Proteomics, Dublin, IRLANDE :

R.Longuespée, C.Boyon, O.Kerdraon, A.desmons, D.Vinatier, R.Day, I.Fournier, M.Salzet
Molecular histology for epithelial ovarian cancers biomarker hunting: new issues for biology and pharmacology.

4. Journées Francophones de recherche en Obstétrique et Gynécologie (JFROG) Décembre 2011, Paris, FRANCE: Prix du meilleur poster (500 euros)

C.Boyon, R.Longuespée, O.Kerdraon, A.desmons, D.Vinatier, R.Day, I.Fournier, M.Salzet
Recherche de nouveaux biomarqueurs des cancers épithéliaux de l'ovaire par imagerie MALDI.

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Microscope de Robert Hooke

Figure 2: Voies d'investigations en protéomique tissulaire

Figure 3: Les différentes parties composant un spectromètre de masse

Figure 4: Différents types de surfaces composant les chips SELDI

Figure 5 : Préparation de l'échantillon et fonctionnement de la source MALDI

Figure 6 : Mode de fonctionnement des analyseurs en temps de vol, en mode linéaire et réflecteur

Figure 7: Fonctionnement des modes microsonde et microscope en imagerie moléculaire

Figure 8: Modes d'application des analyses directes sur coupe

Figure 9: Mode d'analyse top-down et bottom up en protéomique

Figure 10: Différents modes de dépôt de la matrice

Figure 11: Etapes de préparation et d'analyse des tissus pour les modes profiling et imagerie

Figure 12: Utilisation de calculs statistiques pour l'élaboration de profils moléculaires de tissus HER2+

Figure 13: Profils moléculaires des tissus HER2+

Figure 14: Discrimination de sous types moléculaires autour des frontières tissu sain/cancéreux par calcul statistique

Figure 15: Représentation tridimensionnelle de l'information d'un spectre composé de 3 pics

Figure 16: Mode de fonctionnement de l'analyse PCA

Figure 17: Classification de tissus malins par Support Vector Machines et représentation en pseudo gel des spectres des différents grades de la pathologie.

Figure 18: Combinaison de l'imagerie IRM et de l'imagerie MALDI pour la localisation de marqueurs moléculaires

Figure 19: Classification hiérarchique de sous types moléculaires de myxofibrosarcome

Figure 20: Classification hiérarchique de sous types moléculaires de cancer gastrique

Figure 21: Découverte du fragment Cterminal Reg-Alpha comme marqueur du cancer de l'ovaire

Figure 22: Les différents types de proprotéines convertases et leurs domaines

Figure 23: Localisation intracellulaire des proprotéines convertases

Figure 24: Mécanismes de la métastase et implication des différents substrats des proprotéines convertases

Figure 25: Expression de différentes PC dans le cancer de l'ovaire, pour des survies des patientes supérieures ou inférieures à 5 ans

Figure 26: Spectres de masse d'analyse directe de coupes de cerveaux de rat

Figure 27: Analyses directes MALDI de coupes de cerveau de rat non traitées ou traitées à l'urée

Figure 28: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes non traitées et traitées par un dépôt de 10µL de TFA 10%, par un bain de TFA 10% ou par l'exposition à des vapeurs de TFA 10%

Figure 29: Coupe de cerveau de rat traitée aux vapeurs de TFA 10% et spottée de SA 10mg/mL

Figure 30: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes traitées par exposition aux vapeurs de TFA 10% ou traitées par exposition aux vapeurs de TFA 10 puis dépôt de TFE, dépôt de SA 40mg/mL dans ACN/TFA0.1%

Figure 31: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de traitées par exposition aux vapeurs de TFA 10%, dépôt de TFE, dépôt de SA EtOH 20mg/mL puis SA 40mg/mL dans ACN/TFA0.1% 7 :3

Figure 32: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes traitées par trois couches de matrice: SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3, SA HFIP, SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3, et deux couches de matrice : SA HFIP, SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3

Figure 33: Résultats de séparations en électrophorèse bidimensionnelle des protéines extraites avec un mélange ACN/TFA0.1% 7 :3 et avec le solvant HFIP

Figure 34: Identification des protéines présolubilisées dans le solvant HFIP

Figure 35: Perspectives pour la réalisation d'analyses moléculaires sur tissu et en gel d'électrophorèse bidimensionnelle.

Figure 36: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes sur AutoFlexIII avec le détecteur MCP et le détecteur CovalX

Figure 37: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes traitées par dépôt de trois couches d'acide sinapinique: SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3, SA HFIP, SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3 ; sur AutoFlexII avec le détecteur MCP et le détecteur CovalX

Figure 38: Images de protéines de hautes masses

Figure 39: Différentes voies d'investigation pour l'analyse de tissus pour la recherche de biomarqueurs

Figure 40: Résultats obtenus de l'analyse de classification hiérarchique d'une image de tissu digéré à la trypsine

Figure 41: Corrélation des données de classification hiérarchique et d'analyses PCA

Figure 42: Images des sous types moléculaires retrouvés sur coupes de cerveau de rat après analyses par classification hiérarchique et comparaison avec les régions morphologiques, après images ISD

Figure 43: Analyse de classification hiérarchique sur biopsies de cancer de la prostate

Figure 44: Détermination de signatures moléculaires tissulaire des tissus bénins, borderline du cancer de l'ovaire, dans la gamme de masse des protéines de hautes masses, de masses intermédiaires et des peptides

Figure 45: Analyse PCA et image du fragment C-terminal de Regalpha

Figure 46: Validation de Reg-Alpha par imagerie MALDI, immunohistochimie, Western Blot, validation des transcrits de Reg-alpha

Figure 47: Validation de Cter-Reg Alpha par immunohistochimie sur différents types de cancer de l'ovaire

Figure 48: Comparaison des signaux obtenus pour le m/z 9744 avec le traitement HFIP, et un dépôt classique de matrice

Figure 49: Profilage de Cter Reg Alpha dans la zone cancéreuse d'une biopsie de cancer de l'ovaire de stade 1 de type séreux, validation par immunofluorescence

Figure 50: Profilage de Cter Reg Alpha dans la partie cancéreuse d'un tissu de cancer de l'ovaire de type séreux de stade 1

Figure 51: Profilage de Reg Alpha dans un tissu de type endométrioïde de stade 1

Figure 52: Validation de la présence du fragment Cter de Reg Alpha dans divers types de tissus, à différents stades de la pathologie

Figure 53: Profilage de Cter Reg Alpha dans un tissu borderline de type mucineux

Figure 54: Validation de RegAlpha dans des tissus borderline par immunohistochimie

Figure 55: Perspectives pour la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire

Figure 56 : Schématisation de la théorie de l'origine ectopique des cancers de l'ovaire épithéliaux

Figure 57: Profils moléculaires de cancer de l'ovaire séreux et de trompe de Fallope

Figure 58: Analyse moléculaire de tissus de cancer de l’ovaire endométrioïde et de l’endomètre

Figure 59: Distributions relatives des processus cellulaires et des fonctions moléculaires des protéines identifiées communément entre les tissus de cancer de l’ovaire et de cancer de la trompe

Figure 60: Réseaux d’interaction des protéines communes entre le cancer de l’ovaire séreux et le cancer de la trompe d’une même patiente

Figure 61: Distribution des fonctions moléculaires et des processus cellulaires relatifs aux protéines spécifiques des cancers de l’ovaire et de la trompe et réseaux d’interaction des protéines annotées comme des protéines de néoplasie ovarienne dans la banque de données NCI

Figure 62: Expression des PC dans la lignée cellulaire SKOV3

Figure 63: Schématisation de la technologie des shRNA

Figure 64: Expression de PACE4 dans les différentes lignées SKOV3 shPACE4

Figure 65: Expression de PC7 dans les lignées SKOV3 sh PC7

Figure 66: Expression de Furine dans les lignées SKOV3 shFurine

Figure 67: Expression de PC5/6 dans les lignées SKOV3 sh PC5/6

Figure 68: Test de prolifération des lignées SKOV3 shNonTarget, shFurine, shPC7, shPACE4

Figure 69: Test de clonogénicité des lignées SKOV3 shNT, shFurine, shPC7, et shPACE4

Figure 70 : Volumes moyens des tumeurs de lignées SKOV3shPC au cours du temps après implantation

Figure 71: Poids moyen des tumeurs des différentes lignées 52 jours après implantation

Figure 72: Souris Nu/Nu xénotreffées avec les lignées SKOV3 shNonTarget et shPACE4 et tumeurs reséquées

Figure 73: Perspectives pour les expériences *in vivo* des lignées shPC : applications pour la recherche de biomarqueurs et de suivi pharmacologique

Figure 74: Instrumentation Triversa Nanomate d’Advion permettant le LESA

Tableau 1: Différentes matrices utilisées pour l’analyse de biocomposés

Tableau 2: Les différents types d’instruments utilisés pour l’imagerie MALDI, et leurs propriétés

Tableau 3: Biomarqueurs du cancer de l’ovaire trouvés dans le gel d’électrophorèse bidimensionnel

Tableau 4: Liste des biomarqueurs retrouvés dans les analyses bottom up des biopsies du cancer de l'ovaire

Tableau 5: Instruments permettant le dépôt de matrice sur coupes de tissus.

Listes des abréviations

1,5 DAN: 1,5 DiAminoNaphtalen

ACN: Acetonitrile

ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase

ADAM-TS: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AGP: Alpha1 acid Glycoprotein

Ani: Anilin

AP: Amino Pyridine

APOA1: Apolipoprotein-A1

ARN: Acide Ribonucléique

A.U.: Arbitrary Unit

B2M: beta2-microglobulin

BEHAB: Brain Enriched HyAluronan Binding protein

CA 15-3: Cancer Antigen 15-3

CA 72-4: Cancer Antigen 72-4

CA-125: Cancer Antigen 125

CAM: Cell Adhesion Molecule

CART: Classification And Regression Tree

CD46: Membrane cofactor protein CSF1: Macrophage colony-stimulating factor 1

DHAP: Di Hydroxy Aceto Phenon

DHB: DiHydroxyBenziocAcid

EGFR: Epithilial Growth Factor Receptor

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EphA2: Ephrin Receptor

ERK: Mitogen-activated protein kinase 3

ESI: Electro Spray Ionisation

Fas-L: Fas Ligand

FDA: US Food and Drug Administration

FFPE: Formalin Fixed and Parrafin Embedded

FN: Fibronectin

FT-ICR: Fourier Transformé-Ion Cyclotron Resonance
HCCA: HydroxyCinnamic alpha-Cyano-4-Acid
HE4: Human Epididymis Protein 4
HFIP: HexaFluoroIsoPropanol (1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol)
HGF: Hepatocyte Growth Factor
hK: human Kallikrein
Hp: Haptoglobin
HPLC: High Pressure Liquid Chromatography
HSP: Heat Shock Protein
ICAM: Intercellular Cell Adhesion Molecule
ICAT: Isotope-Coded Affinity Tag
IGF: Insulin-like Growth factor
IL13: Interleukin-13
IL6R: Interleukin 6 Receptor
InVS: Institut de Veille Sanitaire
ITO: Indium Tin Oxide
KD: Knock Down
KL-1: Katanin-like protein
LAR: Leukocyte common Antigen-related Receptor
LASA: Lipid Associated Sialic Acid
LC: Liquid Chromatography
LDI: Lazer Desorption Ionization
LPAATB: Lysophosphatidic Acid Acyltransferase
M: molaire
M2-PK: Pyruvate Kinase Tumor M2
MadCAM: Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MCP: Micro Channel Plate
MEKK2: Mitogen-Activated Protein Kinase/extracellular signal regulated Kinase Kinase 2
MIF: Macrophage Inhibitory Factor
MMP: Matrix Metalloproteinases
MPK1: Mitogen-activated Protein Kinase 1
MRM: Multiple Reaction Monitoring

MS: Spectrométrie de Masse
MSI: Mass Spectrometry Imaging ou imagerie par spectrométrie de masse
MT-MMPs : Membrane Type Matrix Metallo Proteases
NCI: American National Cancer Institute
NGAL: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NGF: Nerve Growth Factor
NGFR: Nerve Growth Factor Receptor
OCT: Optimal Cutting Temperature
PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PC: Proprotéine Convertase
PCA: Principal Component Analyses (Analyses en composante principale)
PEDF: Epithelium Growth Factor
Protein Kinase: PK
PTH: ParaThyroid Hormone
Pyr: Pyridin
SA: Sinapinic Acid
SA/3AP: Sinapinic Acid/ 3-Acetyl Piridin
SAM: Significance Analysis of Microarrays
SDA: Symbolic Discriminant Analysis
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SELDI: Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation
sh: small hairpin
SILAC: Stable Isotope Labeling of Amino acids in Culture
SIMS: Secondary Ion Mass Spectrometry
SMALDI-MS: Scanning Microprobe Matrix-Assisted laser Desorption/Ionization Imaging
Mass Spectrometry
SPORE: Specialized Program of Research Excellence
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STIC: Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma
SVM: Support Vector Machines
TF: Transferrin
TFA: Trifluoro Acetic Acid
TFE: Tri Fluoro Ethanol

TGF: Transforming Growth Factor

TLR: Toll like Receptors

TMPP: tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR1: Tumour Necrosis Factor Receptor p60

TNFR2: Tumor Necrosis Factor Receptor 2

TOF: Time of Flight

TQ: Triple Quadrupole

TTR: Transthyretin

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecules

VEGF: Vascular Endothelium Growth Factor

Chapitre 1 : Introduction

Depuis longtemps, l'homme s'est interrogé sur la manière d'explorer son environnement afin de décrypter les informations codées qui composent la réalité. Sa vision n'est qu'une interprétation élaborée des phénomènes physiques l'entourant. Cette perception est complètement relative à son évolution biologique et son histoire personnelle *i.e* son expérience dans un contexte social défini.

L'évolution récente des pensées, et notamment le détachement des esprits des dogmes religieux, a conduit l'homme moderne à s'armer d'outils qui lui permettent de « sonder » les imperceptibles lois du vivant. Les premières lignes de Claude Bernard, dans son « *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* » (1865) résumant parfaitement ce périple de la quête du savoir :

« L'homme ne peut observer les phénomènes qui l'entourent que dans des limites très restreinte, le plus grand nombre échappe naturellement à ses sens, et l'observation simple ne lui suffit pas. Pour étendre ses connaissances, il a dû amplifier, à l'aide d'appareils spéciaux, la puissance de ces organes, en même temps qu'il s'est armé d'instruments divers qui lui ont servi à pénétrer dans l'intérieur des corps pour les décomposer et en étudier les parties cachées »

Cette pensée, à l'époque, résume et à la fois prévoit les événements scientifiques qui rythmeront l'ère de la science. L'homme moderne sera capable de mettre à profit les mécanismes physiques pour accéder aux plus infimes échelles du réel.

La première curiosité humaine nous a conduit à l'observation de l'infiniment petit. La plus vieille lentille fabriquée à partir de verre poli a été datée à environ -700. Celle-ci a été découverte à Ninive, le dernier territoire Syrien au Kurdistan. Des écrits de la Rome antique mentionnent aussi des outils plus élaborés comme des poches d'eau ou des émeraudes aux formes de lentilles concaves. La première utilisation scientifique de ces lentilles est survenue au cours du XVII^e siècle, celles-ci ne servant auparavant qu'à la correction de la vue.

L'invention du premier microscope est difficile à attribuer étant donné que différents types ont été fabriqués à la même période. Cependant, les observations de plus grande qualité ont été réalisées par Antoni Van Leeuwenhoek et Robert Hooke.

En 1664, Robert Hooke utilise un jeu de boules et de lentilles de verre pour agrandir l'image de poux, de champignons et de cellules végétales dont il publiera les observations dans le journal *Micrographia*. C'est alors que fut inventé le premier microscope optique. Parallèlement, en 1668, alors qu'il cherchait un moyen de compter les fils des tissus, le drapier Hollandais Antoni Van Leewenhoek fabriqua un autre type de microscope. A partir d'observations faites de sa salive, il fût alors le premier à décrire les bactéries qu'il appellera « levende dierkens » pour animalcules vivants.



Figure 1 : Microscope de Robert Hooke

Dès lors, l'observation humaine ne se limita plus au simple organe sensoriel qu'est son œil mais fût capable de fabriquer un outil qui lui permit d'observer le vivant de manière plus fine.

L'évolution des premiers microscopes permit d'accéder à la notion de tissu biologique et à poser les fondements de l'histologie. En 1799, dans son « *Traité des membranes en général et de diverses membranes en particulier* », Bichat définit alors un tissu comme un ensemble de cellules ayant des caractères morphologiques analogues. L'observation de coupes minces d'organes permet alors d'accéder à une échelle inférieure à celle de

l'anatomie. Les fonctions des organismes vivants complexes sont régies par des structures dédiées.

Les XIXe et XXe siècles furent ensuite animés par la succession de découvertes qui conduirent à notre vision moderne de l'organisation du vivant.

En 1839, Theodor Schwann observe que tous les êtres vivants sont constitués de cellules, et que ces « petites chambres », déjà décrites par Robert Hooke, sont l'unité commune de structure et de développement de tout être vivant, végétal ou animal. Une nouvelle étape est alors franchie dans l'exploration du vivant. La cellule est alors perçue comme la « micro entreprise » du vivant, c'est là que sont élaborées les fonctions de base du vivant.

A partir de 1890, les images furent affinées grâce aux développements de techniques de revêtement, et le champ de vision s'est élargi. Depuis cette époque, la structure de base du microscope n'a pas changé. Pour obtenir une meilleure résolution, il faudra attendre le développement du microscope électronique, introduit en 1930, avec un grossissement de 800000x. Les avancées majeures ont été faites au niveau des optiques, les mécaniques et la lumière. Depuis son invention, la gamme de grossissements des microscopes va de 200x à 1500x en moyenne, ce qui signifie que la majorité des observations sont faites pour des tailles entre 200 et 400 fois plus petites que la taille de l'objet observé. Juste avant la seconde guerre mondiale, deux avancées techniques dans les optiques ont été apportées, le contraste de phase (inventé par Zernike) et le contraste par interférence. Cela a permis l'observation d'objets transparents, comme les cellules vivantes.

En parallèle aux microscopes, des techniques d'immunohistochimie permettant la localisation d'antigènes dans les tissus, cellules, organismes, bactéries, virus, etc., ont été introduites. L'immunohistochimie est née à la fin des années 1930. En 1940, Conn et ses collaborateurs ont développé un anticorps couplé avec un traceur fluorescent. De nouvelles procédures de fixation (éthanol, méthanol, acétone, acide picrique et paraformaldéhyde) furent parallèlement développées ainsi que l'enrobage de tissus dans la paraffine et les procédures d'« antigen retrieval ». A ce jour, des développements sont faits pour l'immunohistochimie en multiplex.

En résumé, l'imagerie des tissus par microscopie nous permet de localiser de nombreuses molécules d'intérêt à une résolution cellulaire ou subcellulaire. La limite de la méthode est la détection d'environ 50 antigènes différents simultanément. La limite actuelle majeure de cette technologie est le tissu en lui-même et les méthodes pour sa préservation. Tous les développements faits pendant les sept dernières décennies sur la préparation du tissu sont sur le point de devenir les fondements pour l'imagerie MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption ionization). Aujourd'hui, on peut se poser les questions suivantes : peut-on tirer profit de ce savoir afin d'améliorer la technologie et qu'apportera la technologie d'imagerie MALDI dans le domaine de l'imagerie des tissus ?

Depuis son introduction dans les années 1980, le MALDI est devenu un outil de choix pour l'analyse des biomolécules, spécifiquement de larges composés. Devant le besoin croissant d'information moléculaire sur les peptides et les protéines et grâce à la facilité des sources MALDI pour l'analyse d'échantillons bruts, des analyses directes sur tissus ont été envisagées rapidement. De nombreuses analyses de peptides de cellules ou d'organelles de différents invertébrés ont été reportées à partir des années 1990, et beaucoup d'entre elles concernent l'étude de la maturation de neuropeptides à partir de leurs précurseurs. En tirant profit de la grande sensibilité de la spectrométrie de masse MALDI, l'analyse directe de cellules uniques a également été envisagée. L'analyse directe offre le grand avantage de permettre l'étude de cellules dans leur contexte naturel, en évitant de longues étapes de purification et de séparation. Dans cette optique, il a été nécessaire de tirer profit du savoir acquis par d'autres techniques de spectrométrie de masse telles que le LDI (Laser Desorption Ionization) ou le SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), et alors le lien entre les méthodes histologique et de spectrométrie de masse a pu être créé.

Le MALDI, comme d'autres techniques de désorption, a été développé à partir de la physique, où l'imagerie de surfaces d'échantillons est tout à fait commune. En effet, un nombre important de technologies d'imageries différentes a émergé, contrairement à d'autres techniques de spectrométrie de masse qui ont leurs racines dans le domaine de la chimie où l'analyse porte principalement sur des liquides et où les aspects morphologiques ne sont généralement pas d'une importance majeure. Cet aspect manquant à l'analyse a été développé à la fin des années 1990 par le groupe de B.Spengler, qui a reporté que des données acquises sur des échantillons solides pouvaient être traitées pour reconstruire des courbes de densité ou

des images moléculaires de biomolécules. Le groupe de R.M. Caprioli a quant à lui réalisé l'automatisation de cette méthode au niveau des coupes de tissus grâce au développement d'un logiciel informatique et a permis ainsi la naissance de l'imagerie MALDI.

A l'heure actuelle, les analyses par spectrométrie de masse directes sur tissus sont bien adaptées à des investigations en protéomique clinique. Aux techniques d'imagerie du vivant et d'histologie, une dimension moléculaire peut désormais être envisagée. Après les fulgurantes avancées des XIX^e et XX^e siècles dans les connaissances en biochimie et dans le développement de technologies pour les études en protéomique, il est possible de sonder le statut physiopathologique de tissus de natures différentes, dans leur contexte anatomique.

Seulement 350 ans après l'invention du premier microscope, et suite à une explosion d'inventivité associée à l'entrée de l'humanité dans une ère de pensée moderne, l'homme a progressivement pu voir le vivant à différentes échelles et en cerner les mécanismes. Il a désormais une connaissance accrue des acteurs de la « machine » physiologique et moléculaire qu'il est et il est désormais possible de connaître les molécules responsables des pathologies qui l'affectent. Désormais, l'imagerie par spectrométrie de masse permet d'associer la technique d'histologie à la dimension moléculaire du vivant, dont il n'a pu cerner les aspects fondamentaux que très récemment.

Cette thèse de doctorat est articulée en deux parties, consistantes avec les différents travaux réalisés au cours de ces trois ans de cotutelle entre le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée de l'Université des Sciences et Technologie de Lille, et l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke.

La première consiste au développement de la méthode d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI et à son application pour la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire, que j'ai utilisé comme méthode pour découvrir de nouveaux marqueurs de la pathologie.

La deuxième partie de cette thèse consiste à l'étude de l'implication des proprotéines convertases dans le cancer de l'ovaire. Le rôle de ces protéases à sérines a été mis en évidence dans différents types de cancers par la maturation de différents substrats connus pour être impliqués dans diverses étapes de cancérisation. Cette partie consiste à la création de modèles

cellulaires qui permettront de déterminer si la sous expression de certains de ces enzymes permet d'atténuer les certains caractères cellulaires propres au cancer.

Je conclurai ce manuscrit par les perspectives envisageables permettant de lier les études de biologie fondamentale avec les analyses pour la recherche de biomarqueurs et leurs applications en pharmacologie.

Chapitre 2 : Le cancer de l'ovaire, état de l'art de la recherche de biomarqueurs

2.1. Le cancer de l'ovaire, un « tueur silencieux »

Malgré d'énormes progrès dans le domaine de la recherche contre le cancer, cette maladie représente une des causes principale de mort dans le monde. Pour nombre d'entre eux, la précocité du diagnostic permet un traitement efficace de la maladie. L'identification de molécules qui pourraient être utilisées comme des indicateurs de l'apparition précoce de la maladie, alors qu'elle est encore localisée, est nécessaire pour un traitement efficace.

Les cancers de l'ovaire épithéliaux sont des pathologies à évolution « silencieuse », tant les symptômes ne sont perceptibles que généralement tardivement. C'est pourquoi cette malignité est souvent appelée « silent killer » (1). Ils sont en France au 7ème rang des cancers chez la femme (2) et au 3ème rang des cancers gynécologiques après celui du sein et du col utérin. Il est la 4ème cause de décès par cancer chez la femme en représentant 5,5% des décès par cancer dans cette population (3)(4). Les rapports de l'Institut de Veille sanitaire (InVS) projettent pour l'année 2011 en France 4617 cas et 3154 décès. Le taux annuel d'incidence standardisé est de 7,9 pour 100 000 et le risque cumulé sur la vie de cancer de l'ovaire est estimé à 1,2%. Aux Etats-Unis, le risque cumulé sur la vie est de 1,4% en population générale mais augmente jusqu'à 16 à 54% chez les patientes porteuses d'une mutation BRCA 1 ou 2 (5). Après une augmentation de l'incidence jusqu'en 1987, due à une diminution de la parité, on observe une diminution de l'incidence d'environ 1,2% par an grâce à la généralisation de la contraception orale chez les générations les plus récentes. L'évolution de la mortalité est semblable à celle de l'incidence avec une diminution des taux plus importante que pour l'incidence entre 2000 et 2005. Le taux annuel moyen d'évolution sur cette période est de – 2,8 %. Le risque relatif d'avoir ou de décéder un cancer de l'ovaire diminue donc pour les patientes nées après 1933.

Ce cancer touche donc les patientes en péri ou post ménopause, avec un âge moyen de 63 ans. Le cancer de l'ovaire a pour caractéristique un très mauvais pronostic dû à son diagnostic souvent tardif. 65 à 80% des patientes sont diagnostiquées à un stade avancé (IIIB, IIIC et IV) (5-10). La survie à 5 ans tous stades confondus est de 39%, elle passe d'environ 80% pour les stades IA à 15% pour les stades III et IV (4, 8, 10, 11). Ceci est en partie dû au fait que le cancer de l'ovaire ne se manifeste que par des symptômes non spécifiques parfois absents, même à un stade avancé (1). En effet, généralement asymptomatique au moment du

diagnostic, plus de 70% des patientes affectées par le cancer de l’ovaire présentent déjà un stade avancé de la maladie (12).

De plus, il n'existe pas de stratégie de dépistage devant l'absence de marqueurs pertinents. Les conditions idéales pour un biomarqueur seraient une sensibilité de 100% et une spécificité de 99,6% qui correspond à une valeur prédictive positive de 10% (13, 14).

L'évaluation et la validation de biomarqueurs nécessite des procédures rigoureuses pour en assurer la validité clinique. Ce processus suit différentes étapes, incluant la découverte, l'exploration préclinique, les essais cliniques, la validation, et le criblage prospectif pour le suivi de la maladie (12, 15).

De plus, dans le cancer de l’ovaire, il est reporté l’existence de plusieurs sous types histologiques pouvant être distingués, reflétant différentes étiologies. Cette hétérogénéité de catégories de néoplasmes pourrait alors expliquer les propriétés des différentes tumeurs et pourrait être mis en évidence par une différence dans les biomarqueurs détectés. Le criblage génétique et la protéomique pourrait alors être utiles pour la découverte de biomarqueurs et le suivi de l’efficacité de traitements comme ceux actuellement utilisés pour le traitement du cancer et permettre une thérapie plus adaptée (12, 16).

2.1.1. Le dépistage du cancer de l’ovaire

En clinique, Cancer Antigen 125 (CA-125) est le biomarqueur le plus utilisé pour la détection des cancers de l’ovaire épithéliaux. Découvert en 1981, c’est le seul marqueur sérique significativement associé au cancer de l’ovaire. Cependant, il a également été mis en évidence dans le cas de l’endométriose, mais aussi des affections bénignes causant des inflammations pelviennes. Normalement, le niveau sérique de CA 125 est de moins de 35U/ml. Ce taux est augmenté de 90% chez des patientes ayant un stade avancé de cancer (stades III et IV) mais seulement de 50% pour les patientes au stade précoce de la maladie. Cette protéine appartient à la famille des mucines, une protéine de haute masse moléculaire qui normalement couvre les épithéliums (17, 18). En vertu de leur localisation, les mucines ont des fonctions extrêmement importantes dans la physiologie cellulaire comme, par exemple, l’adhésion. Des altérations dans les structures en oligosaccharides ont été mise en

évidence dans différentes formes de cancer (19). CA 125 est un marqueur utile pour le suivi de la réponse à la chimiothérapie, afin de prédire les récurrences et pour la discrimination entre les masses bénignes et malignes (20, 21). Le développement d'un algorithme calculant le risque d'avoir un cancer de l'ovaire, basée sur des valeurs de CA125 a montré que 20% des cancers de l'ovaire ont peu ou pas d'expression de CA 125 et a démontré l'importance de l'identification de marqueurs sériques additionnels, de même que de nouvelles molécules capable de remplacer ou de compléter CA125, pour faciliter une détection précoce du cancer de l'ovaire (22).

A l'heure actuelle, l'ultrasonographie transabdominale ou transvaginale a été proposée en combinaison à la détection de CA-125 pour un dépistage de masse et une détection des cas précoces de cancer de l'ovaire (23). Des études confirment l'efficacité de cette combinaison pour le dépistage du cancer de l'ovaire, mais une étude du NCI (American National Cancer Institute) a montré que ces deux modes de dépistages, seul ou en combinaison peuvent aussi produire un nombre important de faux positifs, conduisant à des chirurgies inutiles (24). Par ailleurs, l'échographie pelvienne souffre d'une trop faible spécificité (39 à 87%) pour caractériser les tumeurs ovariennes, même avec l'aide du doppler couleur, rendant nécessaire le recours l'IRM et donc impossible son utilisation pour un dépistage de masse.

Le dépistage de masse par échographie pelvienne ou dosage du CA-125 n'est donc pas une méthode pertinente. L'inefficacité d'un dépistage associant dosage du CA-125 et échographie pelvienne est montrée par une étude américaine qui a utilisé cette stratégie de dépistage annuel chez 35000 patientes. 70% des patientes présentant un cancer de l'ovaire ont malgré tout été diagnostiquées à un stade avancé, soit un résultat similaire à une population ne bénéficiant pas d'un tel dépistage (6). Il est tout de même parfois réalisé pour les 5 à 10% de patientes présentant un contexte héréditaire de cancer de l'ovaire et du sein, avec une mutation du gène BRCA 1 ou 2. Même dans ces conditions, le dépistage présente un faible intérêt en termes de réduction de mortalité. La meilleure option pour ces patientes est alors l'annexectomie prophylactique (11).

2.1.2. Les biomarqueurs du cancer de l'ovaire

Les meilleurs résultats obtenus pour la détection précoces de cancers de l'ovaire furent alors la détection combinée de CA125 avec d'autres marqueurs sériques. Par exemple, les

niveaux sériques totaux d'inhibin sont des marqueurs sensibles et spécifiques des cancers de l'ovaire épithéliaux pour des patientes ménopausées, la production d'inhibin par les ovaires étant arrêtée après la ménopause, mais continuant pour les tumeurs ovariennes. Après la ménopause, les niveaux d'inhibin circulante sont indétectables mais élevés pour les patientes souffrant d'un cancer de l'ovaire (25). L'inhibin semble être complémentaire à CA-125 et les deux marqueurs ont une sensibilité ainsi qu'une spécificité de 95%. Il existe plusieurs formes d'inhibin, celles-ci étant composées de deux sous unités (alpha, betaA, betaB) formant l'inhibin A ou l'inhibin B. Des études sont en cours afin d'évaluer quelles sont les formes spécifiques du cancer qui pourraient être utilisés avant la ménopause (26).

De nombreux autres marqueurs protéiques ont été trouvés et associés à la présence de cancer de l'ovaire. Parmi ceux-ci, la mesothelin, qui est une protéine de la surface cellulaire présente sur les cellules mésothéliales normales, est fortement exprimée dans de nombreux cancers, incluant le cancer de l'ovaire. Des taux élevés de cette protéine ont été détectés chez des patientes présentant un cancer de l'ovaire (27). De plus, ces taux semblent également être élevés à des phases précoces de la maladie, autant que pour des stades plus avancés (28). La mesothelin sérique serait également un test utile pour le suivi de la maladie car, après chirurgie, une baisse rapide du niveau de cette protéine est observée. D'autres études corrélant la mesothelin sérique avec une information clinique détaillée, comme le stade de la tumeur, la réponse au traitement, seront également à effectuer pour déterminer si la mesothelin sérique à une significativité pronostique et si elle peut être utilisée comme biomarqueur pour effectuer un suivi après d'autres thérapies que la chirurgie (27).

Des résultats probants ont été obtenus pour le pronostic et le suivi de la réponse au traitement. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) est un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses maladies néoplasiques. Il est normalement situé dans le cytoplasme et peut être activé par phosphorylation via l'activation de la voie STAT3 par diverses cytokines, hormones et facteurs de croissances. La voie STAT3 régule diverses réponses biologiques, comme le développement cellulaire, la différenciation, la prolifération, la motilité et la survie. L'expression de STAT3 phosphorylée est augmentée dans les cancers de l'ovaire précoces et sa localisation nucléaire est associée à un mauvais pronostic (29).

D'autres études sont nécessaires afin d'élucider le mécanisme d'activation de STAT3, son effet sur les cibles en aval et son rôle dans la transformation néoplasique des cellules épithéliales ovariennes (30).

Lysophosphatidic Acid Acyltransferase (LPAATB) est un enzyme qui catalyse l'acétylation de l'acide lysophosphatidique, en générant des acides phosphatidiques, qui agissent comme des seconds messagers dans la régulation cellulaire tumorale dans les voies de prolifération et de survie (31). Une augmentation de l'expression de cet enzyme a été corrélée à un faible pronostic et est associée à une survie diminuée. Il pourrait être un outil d'identification de cancers de l'ovaire à haut risque, même pour des tumeurs de phases précoces (32).

Parmi les facteurs pronostiques, il y a aussi de nombreux membres de la famille des Kallikrein humaines (hK), des protéases à sérine, tel que hK8. Ce marqueur pourrait être considéré comme un marqueur de pronostic négatif pour des patientes atteintes de cancer de l'ovaire (33, 34).

La Pyruvate Kinase (PK) est un enzyme clé dans la glycolyse. L'isozyme M2-PK est clivée en une forme dimérique. C'est cette forme dimérique qui est surexprimée dans les cellules tumorales, et est appelée Tu M2-PK pour Pyruvate Kinase Tumor M2 (35, 36). Tu M2PK est sécrétée par les cellules tumorales durant la nécrose et le renouvellement cellulaire. Il apparaît que cette protéine est également largement surexprimée dans le cas du cancer de l'ovaire. Ce marqueur a une sensibilité de 70% et une spécificité de 65% (36).

cMET est un proto-oncogène qui encode pour un récepteur membranaire à tyrosine kinase (37). Il est exprimé chez environ tous les mammifères et joue un rôle important dans différents processus cellulaires. Son ligand est Hepatocyte Growth Factor (HGF) et sa surexpression ou son inactivation est impliquée dans différentes maladies tumorales. cMET aurait un rôle dans le cancer de l'ovaire et pourrait être une cible d'agent thérapeutiques. Il serait surexprimé chez les patientes présentant un cancer de l'ovaire en stade tardif et pourrait être un facteur pronostique potentiel pour les patientes présentant un stade avancé de cancer (38).

Les Matrix Metalloproteinases (MMP) sont un groupe d'enzymes protéolytiques calcium-zinc dépendent, capables de réduire beaucoup de composants de la matrice extra cellulaire, pouvant être produites par les cellules tumorales et stromales (39). Dans les cellules stromales, de hauts niveaux de MMP2, MMP9 et MT1-MPP, sont liés à un faible pronostic chez les patientes affectées de cancers de l'ovaire épithéliaux (40). Les membres de cette famille de protéines sont généralement activés par les proprotéines convertases qui ont été démontrées comme étant des enzymes clés pour l'acquisition du phénotype tumoral et la progression métastatique des cellules cancéreuses (voir ci-dessous).

Il existe donc de nombreux marqueurs qui pourraient représenter de bons témoins de la présence et de l'évolution du cancer de l'ovaire et être envisagés en remplacement de l'utilisation de CA125. On peut également citer Ephrin Receptor (EphA2) (41), un récepteur à la tyrosine kinase, le facteur de transcription Pigment Epithelium Growth Factor (PEDF) (42), les cytokines Interleukin-13 (IL13) (43), Macrophage migration inhibitory factor (MIF) (44), la protéine de la famille des Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (45), Membrane cofactor protein CD46 (46), parmi tant d'autres facteurs protéiques.

Un élément important d'interrogation pour la création de tests de dépistage du cancer de l'ovaire est l'utilisation simultanée de plusieurs marqueurs en complément du dosage de CA 125. L'analyse nommée Classification And Regression Tree (CART), repose sur l'utilisation de 5 marqueurs protéiques: CA 125, le facteur de transcription OVX1, Cancer Antigen (CA) 15-3, CA72-4 et Lipid Associated Sialic Acid (LASA) et a montré une sensibilité augmentée par rapport à l'utilisation de CA 125 seul, 90,6% et une spécificité de 93,2% (47).

L'utilisation simultanée d'un panel de six biomarqueurs que sont leptin, prolactin, osteopontin, Insulin-like Growth factor II (IGFII), Macrophage Inhibitory Factor (MIF) associés à CA 125 pour la détection du cancer a été proposé par l'équipe de Mor (48). Aucun de ces marqueurs, utilisé individuellement ne permettait de différencier de manière adéquate les échantillons contrôle d'ovaire sain et les échantillons de cancer. Cependant, la combinaison des 6 marqueurs simultanément a permis une meilleure différenciation des tissus. Les résultats ont été testés avec 3 algorithmes pour la classification des tissus. Il a été reporté

pour ce test une sensibilité de 97,5%, une spécificité de 99,67% et une valeur prédictive positive de 99,97% pour des stades précoces du cancer de l'ovaire (48).

Certains biomarqueurs incluant Human Epididymis protein 4 (HE4), mesothelin, osteopontin, ont été validés par le comité du SPORE (Specialized Program of Research Excellence) pour leur haute sensibilité et spécificité pour la différenciation des cancers de l'ovaire épithéliaux par rapport aux épithélium ovariens normaux (49). Cependant ces marqueurs n'ont pas atteint le critère de diagnostic précoce du cancer de l'ovaire qui est une valeur prédictive positive de 10% (22).

En 2009, la FDA (US Food and Drug Administration) a approuvé le premier test sérique OVA1, élaboré pour assister la détermination du caractère malin d'une masse suspecte découverte par imagerie médicale. Cependant ce test n'est pas utilisé pour le dépistage et ne peut être utilisé seul. Il a été approuvé pour une utilisation en combinaison avec d'autres évaluations chirurgicales, ce qui réduit son utilité. Ce test repose sur l'immunodétection de cinq protéines incluant apolipoprotéine-A1 (APOA1), beta2-microglobuline (B2M), transferrin (TF), transthyréteine (TTR) et CA-125 (50). En 2010, la FDA a également approuvé le test incluant la protéase sécrétée human epididymis protein 4 (HE4), pour le suivi de la récurrence et de la progression du cancer de l'ovaire. Ce marqueur, utilisé seul, a une sensibilité de 67% et une spécificité de 96% (51). Combiné aux marqueurs mesothelin et CA 125, le test proposé peut détecter les cancers de l'ovaire épithéliaux avec une sensibilité de 93% et une spécificité de 98% (52).

Ces éléments de recherche prouvent que l'utilisation simultanée de plusieurs acteurs de telles ou telles maladies serait judicieuse pour l'élaboration de tests de dépistage puissants. On peut alors avancer que la recherche doit en partie servir la découverte d'autres marqueurs de l'apparition précoce de la pathologie pour en permettre l'utilisation dans un kit de dépistage plus efficace que l'utilisation seule de CA 125. Ce marqueur n'est d'ailleurs utilisé que pour le suivi de la pathologie et de l'efficacité des traitements connus à ce jour pour les cancers de l'ovaire.

L'apparition de nouvelles technologies pour la caractérisation des protéines a dans ce sens contribué à l'explosion des découvertes dans le domaine de la recherche de biomarqueurs de différentes pathologies.

2.2. La protéomique au service de la recherche de biomarqueurs des cancers de l’ovaire épithéliaux

Au niveau de la machinerie moléculaire régissant l’ensemble des mécanismes biologiques, la protéine peut être considérée comme un élément clé. L’action des protéines n’est pas isolée mais intégrée dans un réseau qui implique de nombreuses fonctions cellulaires. Le protéome est ainsi défini comme l’ensemble des protéines d’un organisme dans un contexte biologique et à un instant déterminé. L’avancée des techniques d’identification et de caractérisation des protéines au cours des dernières années a permis d’en étudier leur implication dans divers processus biologiques. La protéomique est donc la science de l’étude des protéines d’un organisme biologique à un instant donné. Elle a pour avantage de permettre l’étude de l’ensemble des protéines dans leur réseau d’interaction et de fonctionnalité, et d’obtenir la cartographie protéique complète d’un organisme.

Depuis ces dernières décennies, la démonstration de puissance des technologies à haut débit a favorisé leur utilisation pour de nombreuses applications biomédicales. Dans ce domaine, elle est devenue un outil incontournable pour l’identification de biomarqueurs et a joué un rôle très important pour la découverte de biomarqueurs du cancer de l’ovaire. En effet, les méthodes de protéomique permettent d’étudier simultanément l’expression de centaines de protéines et de cibler les différents mécanismes biologiques impliqués dans la genèse de la pathologie en étudiant le réseau d’interaction et de fonctionnalité des acteurs de la pathologie. L’analyse différentielle de tissus sains et pathologiques dans des cohortes importantes et dans des conditions standardisées permet de donner la cartographie moléculaire de telle ou telle pathologie.

La présence de biomarqueurs découverts par des techniques de protéomique peut ensuite être validée par des approches classiques telles que le Western Blot, l’Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (53), la microscopie sur de larges cohortes de tissus regroupés en blocs de « tissu microarrays » (54), ou sur différents types de lignées cellulaires (55). Un panel entier de biomarqueur peut également être testé grâce à la technologie des biopuces à protéines (56). Enfin les marqueurs détectés peuvent également être validés par des techniques plus spécifiques de spectrométrie de masse avec l’utilisation du mode Multiple

Reaction Monitoring (MRM) qui permet de quantifier une sélection de peptides tryptiques, chacun de ceux-ci représentant un marqueur candidat (57, 58). La MRM permet en effet, à partir de fragments d'ions d'un peptide, d'en définir les ions signatures. Ces fragments sont alors utilisés pour mesurer la quantité des biomarqueurs dans des fluides biologiques par exemple.

Les méthodes de protéomique utilisées pour la découverte de biomarqueurs potentiels reposent sur l'utilisation de l'électrophorèse en gel des techniques de spectrométrie de masse pour la quantification et la caractérisation directe des composés protéiques. Les voies d'investigation passent par des étapes de préparation de l'échantillon suivies de méthodes pour la séparation des protéines avant l'utilisation de méthodes pour leur identification. La **figure 2** (59) représente bien les différentes stratégies possibles pour l'investigation du protéome. A chaque problématique, un choix adéquat existe pour la préparation et la manipulation de l'échantillon pour la recherche de marqueurs de la pathologie. Leurs principales déclinaisons et leurs applications aux recherches sur le cancer de l'ovaire seront décrites ci-dessous.

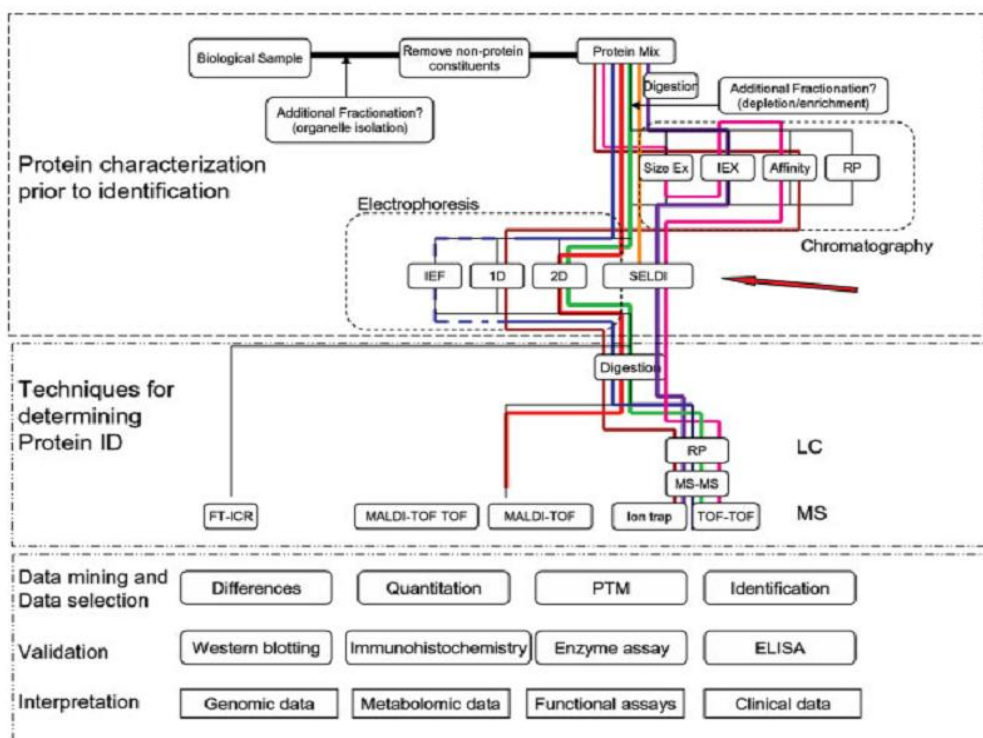


Figure 2 : Voies d'investigations en protéomique tissulaire (59)

2.2.1. Les méthodes en gel

A l'époque de l'émergence de la notion de protéomique, la méthode par excellence pour la recherche de marqueurs potentiels aura été l'électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) (60-62). Il existe plusieurs déclinaisons de la méthode, la plus commune étant la 2D-PAGE (63) qui consiste en la séparation des protéines d'un échantillon selon une première dimension de point isoélectrique de ces protéines. La seconde dimension va ensuite consister à séparer les protéines de la première dimension selon leur masse moléculaire sur un gel SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) PAGE. La 2D-PAGE a été utilisée pour comparer l'expression et l'identité des protéines différentiellement exprimées entre des tissus tumoraux et normaux (64). Les avancées techniques de la technologie d'électrophorèse 2D ont conduit à l'utilisation de gels de plus larges formats et de meilleures résolutions, de méthodes de coloration plus sensibles, et à l'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification des protéines (65). La spécificité de la 2D PAGE a été augmentée avec l'utilisation de la microdissection laser (60, 62, 66-68). Cette méthode a été un outil puissant dans le domaine de la protéomique car il permet de se procurer une population pure de cellules. Grâce à cette méthode, il est possible de procéder à la séparation, au sein d'un même tissu, des cellules normales des malignes et de faciliter l'analyse et la comparaison de composition en ADN (acides désoxyribonucléiques), ARN (acides ribonucléiques) et protéines entre ces populations (60, 62, 66-68). A titre d'exemple, un couplage microdissection laser et séparation en électrophorèse 2D a révélé que FK506 binding protein de 52 kDa (69) et la RhoG protein dissociation inhibitor ainsi que la glyoxalase étaient surexprimées dans les cancers de l'ovaire invasifs en comparaison avec les cancers de l'ovaire à faible malignité (70).

Cette méthode a permis de caractériser de nombreux marqueurs potentiels mais ne permet malheureusement pas de séparer ou de détecter les protéines de bas et moyens poids moléculaires (<15000Da) du protéome. Ce point est un désavantage dans le sens où il a été reconnu que cette gamme de masse basse pourrait contenir de nombreux peptides qui pourraient avoir été clivés via des processus normaux ou pathologiques (60, 71, 72). Dans ce sens, les techniques basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse représentent un outil adapté pour la recherche d'un bon nombre d'acteurs de la genèse de la pathologie.

2.2.2. Les méthodes basées sur la spectrométrie de masse

Les approches « hors gel » ont, depuis une dizaine d'années, suivies d'importantes avancées. La spectrométrie de masse est aujourd'hui l'outil de référence en protéomique pour sa supériorité en sensibilité, haut débit, et sa versatilité pour la visualisation de différentes catégories de protéines associées à diverses pathologies. La composition classique du spectromètre de masse est la suivante : la source d'ionisation, l'analyseur de masse, et le détecteur de courant ionique, représentés dans la **figure 3**. Cet agencement permet une multiplicité de combinaisons pour accéder à des caractéristiques d'analyse voulues. Le principe général de la spectrométrie de masse repose donc sur l'ionisation des composés de l'échantillon, les ions sont ensuite dirigés vers l'analyseur grâce à un champ électrique. La trajectoire ou la vitesse de mouvement des ions dans l'analyseur jusqu'au détecteur, dépendante de leur rapport masse sur charge (m/z) permettra la mesure de ce rapport après conversion au niveau du détecteur du courant ionique en courant électrique. Les informations peuvent ensuite être visualisées via une interface informatique. Les méthodes de spectrométrie de masse présentent l'avantage principal de permettre d'identification des protéines de faible abondance avec une grande sensibilité.

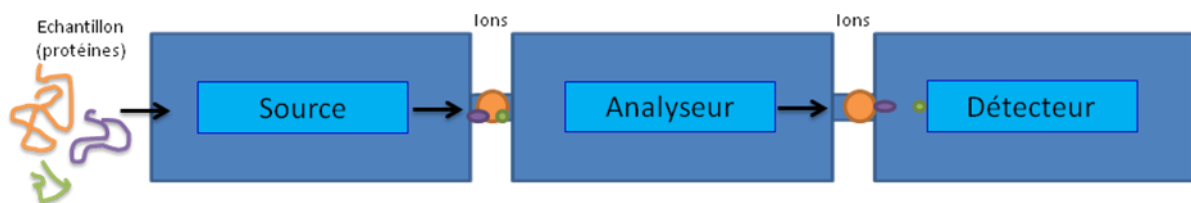


Figure 3 : Les différentes parties composant un spectromètre de masse

Les différentes techniques basées sur la spectrométrie de masse utilisée pour la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire incluent entre autres la FT-ICR (Fourier Transform-Ion Cyclotronic Resonance) MS, l'Orbitrap MS, le Triple Quadrupole (TQ) MS couplés ou non à la chromatographie en phase liquide (LC, Liquid Chromatography), le SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation) TOF et le MALDI TOF (Time of Flight) MS.

Les applications du diagnostic basées sur la spectrométrie de masse évoluent à ce jour dans deux directions : le profiling de protéines pour le diagnostic basé sur la classification via

des groupes de protéines (73) d'une part et la caractérisation de protéines basée sur des techniques de LC-MS « on-line » et via l'utilisation du MALDI TOF en « off-line » (74). Elle peut également être utilisée pour l'étude des interactions antigène-anticorps couplés à des surfaces activées (75). Enfin la métabolomique est également utilisée pour le diagnostic du cancer de l'ovaire (76).

L'avantage principal de l'utilisation de la spectrométrie de masse est de permettre d'accéder à la quantification absolue de marqueurs spécifiques de maladies ainsi que la possibilité d'étudier les modifications post traductionnelles qui jouent un rôle clé dans divers événements de signalisation associés à la progression de la maladie (77).

2.2.2.1. Le SELDI

Le SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation) est une méthode de préparation de l'échantillon adaptée à l'utilisation de la source MALDI. Elle repose sur l'utilisation de puces dont la surface fonctionnalisée possède des affinités chimiques pour les biocomposés de l'analyte. Ce dernier est directement déposé sur la surface, l'interaction avec les éléments de fonctionnalisation opère, et des lavages sont effectués pour retirer les éléments n'ayant pas d'affinité avec la surface. La matrice utilisée pour le processus de désorption/ionisation laser est ensuite déposée sur la surface pour co-cristalliser avec l'échantillon retenu et procéder à l'analyse par spectrométrie de masse. Cette technique présente l'avantage de rapidité de préparation et la possibilité d'utiliser des détergents pour l'extraction des protéines de l'échantillon. Une large variété de surfaces, représentées dans la **figure 4** peut être utilisée pour diverses problématiques et la recherche de composés de diverses natures (78).

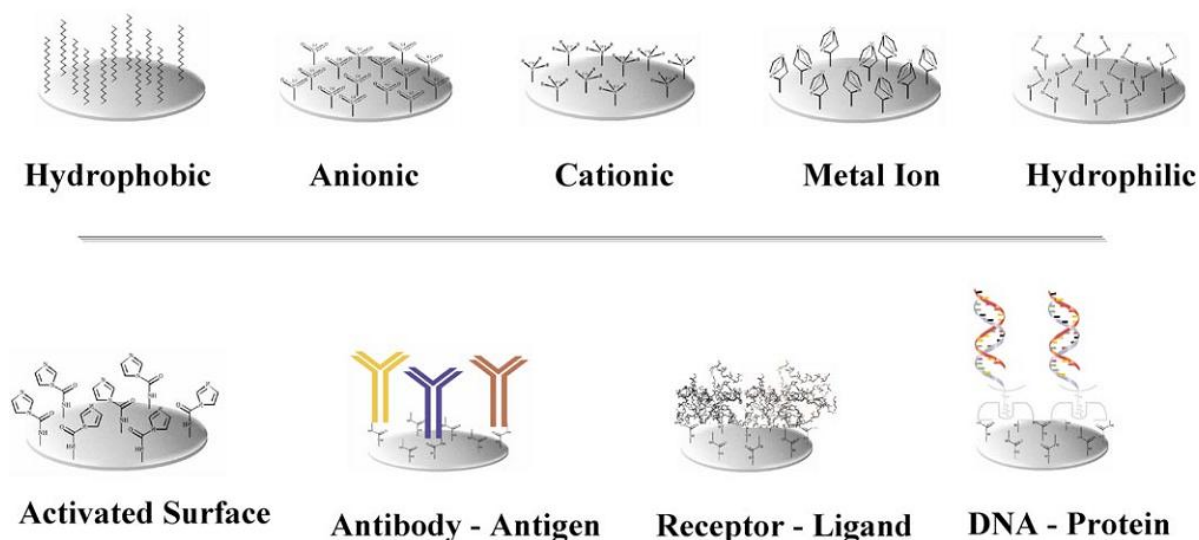


Figure 4: Différents types de surfaces composant les chips SELDI (78).

Le SELDI permet d'identifier rapidement des biomarqueurs de faibles masses moléculaires et des signatures de protéines, en général dans 1 μ L de sérum ou de matériel tissulaire (79). Cette technique est à la frontière entre la chromatographie et le MALDI TOF. Elle peut également être comparée aux tests ELISA pour ses caractéristiques de haut débit, sélectivité, reproductibilité et sensibilité, avec un avantage évident de spécificité grâce au couplage à la spectrométrie de masse qui permet d'avoir la masse des composés détectés (77, 80). Les surfaces pouvant être fonctionnalisées avec des anticorps, la technique du SELDI a également pu être utilisée pour la détection de panels d'antigènes dans le cancer de la prostate ainsi que leur quantification (81, 82).

Une étude a été réalisée par Petricoin et coll. sur les sérums de 50 contrôles non affectés et de 50 patientes atteintes du cancer de l'ovaire. Des groupes de protéines ont pu être déterminés, à partir desquels les cancers de l'ovaires de stade précoce ont pu être discriminés avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 95% et une valeur prédictive positive de 94% (9).

Parmi les quelques marqueurs identifiés par SELDI, on peut citer l'Haptoglobine (Hp), une glycoprotéine sécrétée par les cellules du foie et impliquée dans le métabolisme de l'hémoglobine. Les résultats des tests ELISA ont montré une sensibilité de 64% pour Hp-alpha et une spécificité de 90% seule, et une sensibilité de 91% et une spécificité de 95% combinée avec CA125.

2.2.2.2. Spectrométrie de masse ESI (Electro Spray Ionisation) et découverte de biomarqueurs

Les techniques de chromatographie en phase liquide couplées aux sources d'ionisation en électrospray permettent d'obtenir en une analyse un nombre important de protéines. L'une des études les plus abouties en protéomique sur le cancer de l'ovaire a été réalisée via une méthode de séparation en phase liquide bidimensionnelle : une isoelectrofocalisation liquide suivie par une HPLC (High Performance Liquid Chromatography) en phase inverse, à partir de lysats de cellules de lignées cancéreuse ovariennes. Les éluats de chromatographie furent alors analysés avec un spectromètre de masse ESI TOF. Les protéines séparées en deux dimensions furent alors collectées, digérées et identifiées. 300 protéines ont été identifiées de cette façon (83). Une méthode similaire a été utilisée pour la classification des tissus cancéreux ovariens. 24 tissus ont ainsi pu être classés et les marqueurs des différents sous types identifiés, grâce à l'utilisation de l'analyse PCA pour la différenciation des sous types histologiques (10).

Une dimension quantitative peut également être ajoutée à l'utilisation de ces techniques couplant la LC avec la MS ESI. La méthode la plus populaire de profiling quantitatif est la méthode ICAT (pour Isotope-Coded Affinity Tags). Avec cette méthode, deux échantillons de protéines peuvent être marqués en utilisant des réactifs ICAT composés de carbones légers ou lourds (^{12}C light ou ^{13}C heavy) qui se lient aux peptides contenant des cystéines. Les protéomes des deux échantillons sont ensuite mélangés, digérés, séparés par HPLC et identifiés. Le ratio d'intensité entre les m/z des peptides communs entre les échantillons donne une information sur la quantité de protéines et de marqueurs potentiels des tumeurs par rapport aux tissus sains comparés (84, 85).

Une autre méthode utilisée pour l'identification et la quantification de marqueurs tumoraux est le SILAC (pour Stable Isotope Labeling of Amino acids in Culture). Cette méthode repose sur l'incorporation métabolique d'acides aminés différenciellement marqués. Toutes les protéines seront marquées aux acides aminés SILAC, contrairement aux méthodes ICAT, qui peuvent avoir moins de 100% de marquage. Avec des cellules marquées au SILAC, il est possible de procéder à une purification subcellulaire d'organelles et d'en étudier

le protéome subcellulaire. L'analyse protéomique différentielle par spectrométrie de masse se fait ensuite de la même façon que pour les réactifs ICAT (86). La technique du SILAC requiert cependant son utilisation pour la quantification de protéines issues de cultures cellulaires. Mais cette méthode a également pu être adaptée à la quantification de protéines de tumeurs via l'utilisation du mélange dit « Super-SILAC » de plusieurs cultures cellulaires préparées avec les réactifs SILAC, mélangés à un échantillon tumoral (87).

2.2.2.3. Le MALDI

Parmi les sources d'ionisation, le MALDI fait partie de celles présentant le plus d'intérêt et étant la plus utilisée en protéomique clinique. Le principe de cette source repose sur le processus de désorption et d'ionisation assistée par l'utilisation d'une matrice. Dans les années 1980, Karas et Hillenbrand démontrent que des molécules organiques composées de groupement aromatiques mélangées à un échantillon, permettent, une fois irradiées par un faisceau laser, de détecter les composés de cet échantillon (88). L'analyte et la matrice, déposés sur une surface métallique, et après évaporation du solvant s'organiseront dans un réseau de microcristaux.

Un faisceau laser vient ensuite irradier la surface de la préparation pour permettre l'ionisation et la désorption des composés de l'échantillon. Il existe deux modes d'analyse où les ions tantôt négatifs, tantôt positifs peuvent être détectés. Avec ce mode d'ionisation, on retrouve le plus souvent des ions protonés une seule fois, sous la forme $[M+H]^+$. Les valeurs de m/z détectés sont donc celles de la masse de chacun des composés. Les ions sont ensuite accélérés via l'application d'une différence de potentiel différente selon que l'analyse se fait sur les ions positifs ou négatifs, entre la surface métallique où la préparation aura été déposée et une grille d'accélération. La **figure 5** illustre le principe de la source MALDI.

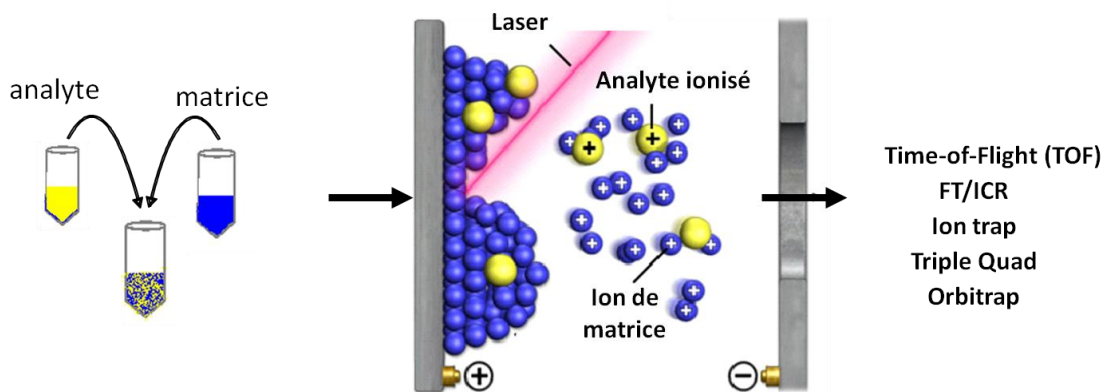


Figure 5 : Préparation de l'échantillon et fonctionnement de la source MALDI

Depuis l'invention de la source MALDI, de nombreux composés ont été développés pour être utilisés en tant que matrice. Ces différentes classes de molécules ont été testées pour l'analyse de diverses catégories des composés et sont listés dans le **tableau 1**. L'obtention de composés monochargés, et le caractère doux de l'ionisation permet l'étude de molécules intactes, et donc d'analyser des molécules intactes. C'est pourquoi le MALDI est en général couplé à l'analyseur en temps de vol (Time Of Flight ou TOF) qui est le seul à permettre l'analyse de molécules d'assez hautes masses moléculaires monochargées.

Molécules à analyser	Matrice (Abbréviation)	Matrice (Nom complet)
Protéines/peptides		
Masse < 10 kDa	CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Masse > 10 kDa	SA	Sinapic acid
	HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid
Laser IR		Succinic acid
Laser UV		2,6-Dihydroxyacetophenone
Laser UV		Ferulic acid
Laser UV		Caffeic acid
Matrice liquide		Glycerol
Matrice liquide		4-Nitroaniline
Oligonucleotides		
Masse < 3.5 kDa	THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenone
Masse > 3.5 kDa	HPA	3-Hydroxypicolinic acid
		Anthranilic acid
		Nicotinic acid
		Salicylamide
Sucres		
	DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid
	CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
		3-Aminoquinoline
Acides	THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenone
Lipides		
	DIT	Dithranol
	DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid
Oligosaccharides		
		1-Isoquinolinol

Tableau 1 : différentes matrices utilisées pour l'analyse de biocomposés

Le principe de l'analyseur TOF repose sur la mesure de la vitesse des ions dans un tube de vol soumis à un vide poussé. En effet des ions de masses différentes accélérés et soumis à un vide poussé auront une vitesse de mouvement différente et sur une distance assez longue, leur ratio m/z ainsi que leur masse, pourront être différenciés. Deux modes existent à l'utilisation du tube de vols en tant que détecteur, *i.e* les modes linéaire ou réflecteur. Le mode réflecteur permet la refocalisation d'ions de même masse qui auraient acquis une énergie cinétique différente lors de leur désorption et auraient donc une vitesse différente. Ce mode, qui nécessite l'utilisation d'un miroir électrostatique, une série d'électrodes aux potentiels décroissants, permet d'obtenir une meilleure séparation des ions et une meilleure résolution spectrale. Cependant, ce mode est largement limité en gamme de masse par rapport au mode linéaire. La **figure 6** représente le principe de l'analyseur en temps de vol dans ces deux modes d'utilisation.

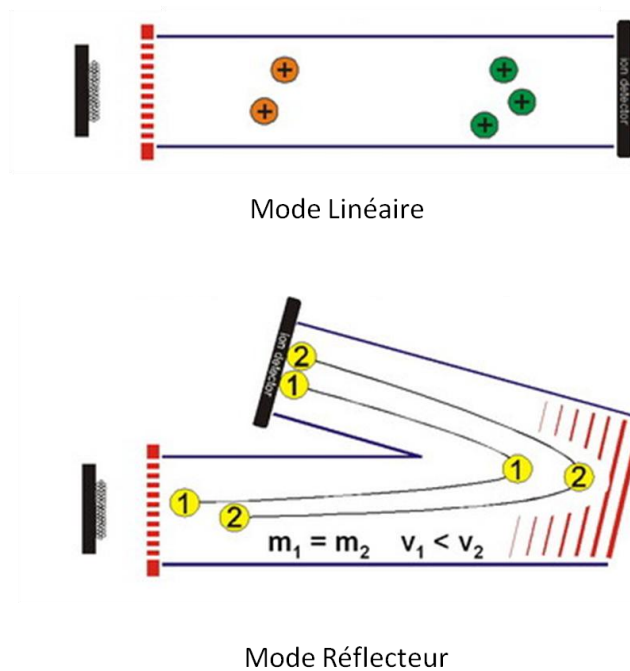


Figure 6 : Mode de fonctionnement des analyseurs en temps de vol, en mode linéaire et réflecteur

Dans le domaine de la recherche de biomarqueurs du cancer de l’ovaire, des profils protéomiques de digestion tryptique ont été décrits. L’utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution a permis la classification de groupes de protéines plus efficaces qu’avec des appareils de faible résolution (8). Des approches en glycoproteomique ont également été développées pour identifier des marqueurs du cancer de l’ovaire. Des changements dans la glycosylation ont été trouvés par MALDI-FT-ICR-MS (89).

2.2.3. L’analyse par spectrométrie de masse directe sur tissu

L’avantage du fait que l’échantillon analysé en MALDI soit solide permet d’envisager une réduction des étapes de préparation de celui-ci, telle que l’extraction, requises pour une analyse en phase liquide. Cet avantage est utilisé pour les analyses directes sur tissu. Les analyses directes sur tissus permettent de donner une réponse rapide sur la composition globale de biocomposés d’un échantillon tissulaire. Il existe donc deux modes d’analyse moléculaire sur tissu, le « profiling » et l’imagerie. Cette approche a montré sa capacité à générer des profils protéiques riches directement à partir de tissus. En comparant des tissus de divers types, il est possible de distinguer les profils de tissus sains par rapport aux cancéreux et de les classer au niveau moléculaire en fonction des différents grades histologiques de la pathologie. Aujourd’hui, en considérant le nombre de publications associées à la recherche de

marqueurs de pathologies utilisant la méthode de profiling ou d'imagerie sur tissu, et plus particulièrement d'analyses MALDI, les techniques d'analyse par spectrométrie de masse directe sur tissus peuvent être apparentées aux techniques connues d'histologie classique. La dimension moléculaire permet de donner le terme d' « histologie moléculaire » à cette approche. Le but actuel de l'imagerie par spectrométrie de masse pour des applications en clinique est de donner un criblage multiplex des biocomposés d'une coupe analysée de manière classique en laboratoire d'anatomo-pathologie. Les techniques d'immunohistochimie classiquement utilisées permettent de révéler la présence de biomarqueurs d'intérêt liés à une pathologie. L'analyse par spectrométrie de masse permet quant à elle de donner le profil de plus d'une centaine de marqueurs potentiels d'une maladie en une seule analyse. Cela permet de donner un nouveau regard au pathologiste sur la pathologie, ses acteurs et en conséquence pourrait l'inciter à une nouvelle appréciation pour son diagnostic et son pronostic.

Comme précédemment mentionné, il existe deux modes de collecte des données à partir d'un tissu : le mode « profiling » et le mode imagerie. Le mode profiling permet d'obtenir une information globale du contenu en biocomposés sur une surface relativement importante de tissu. Ce mode d'analyse requiert peu de temps de préparation de l'échantillon et permet de répondre en général efficacement à des questions simples de localisation moléculaire, lorsque les surfaces à analyser sont assez larges et bien définies. Le mode imagerie par spectrométrie de masse (Mass Spectrometry Imaging, MSI) permet quant à lui de donner une information de localisation précise des biocomposés analysés sur toute la surface du tissu. En effet, en mode imagerie, les analyses par spectrométrie de masse sont réalisées sur toute la surface de la coupe, selon une résolution définie. Une image est composée de pixels d'un nombre défini par unité de surface analysée, en définissant la résolution. Au niveau de l'acquisition des données, il existe à ce jour deux modes connus: le mode microscope et le mode microsonde (**figure 7**). En mode microscope, la surface entière de la coupe est irradiée par la source d'ionisation pour que les ions produits puissent être détectés par un détecteur de position. Ce mode est une translation directe de la microscopie photonique à l'analyse moléculaire sur tissu. Il requiert une grande complexité et une grande précision de montage optique et son utilisation n'a par conséquent jamais été démocratisée depuis son invention. Le mode microsonde est beaucoup plus simple de fonctionnement et de mise en place sur des appareils commerciaux. L'analyse se fait ici point par point sur la surface de la coupe. Selon un pas défini, une analyse de spectrométrie de masse sera réalisée

au niveau de chaque position de la coupe sur sa surface. Un ensemble de mesures de m/z sera obtenu pour chaque spectre de masse et l'intensité relative de chaque élément sera ensuite reportée pour l'ensemble des positions analysées sur la surface de la coupe de tissu. Cette intensité relative sera cartographiée sous la forme d'une image moléculaire par une échelle de couleur. La superposition de cette image avec le scan optique de la coupe analysée permettra de cartographier au niveau histologique la présence relative du composé d'intérêt.

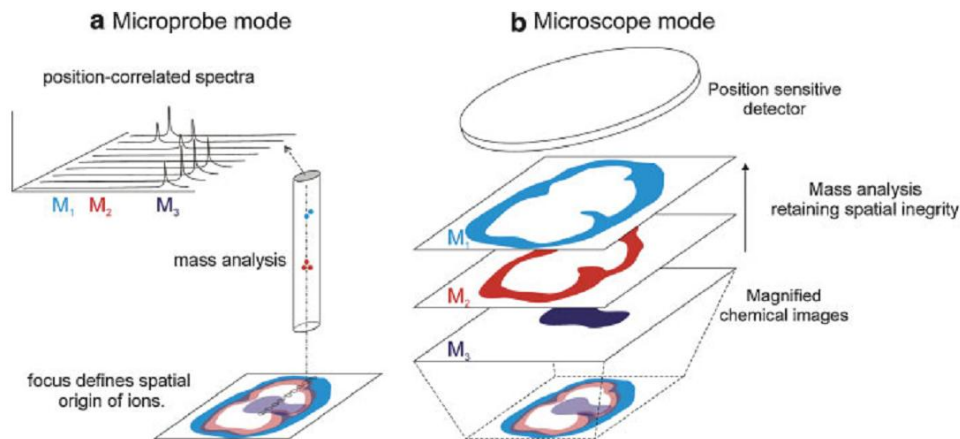


Figure 7: Fonctionnement des modes microsonde et microscope en imagerie moléculaire (90).

Etant donné que l'échantillon à analyser doit être solide, les types de sources utilisées sont limités à celles qui reposent sur le contact d'un faisceau incident avec la surface à analyser. Ce faisceau peut être constitué d'ions primaires accélérés avec la source SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), de gouttelettes de solvants chargées pour le DESI (Desorption Electrospray Ionisation) ou un faisceau laser avec les sources LDI (Laser Desorption Ionisation) et MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation). Le mode d'ionisation MALDI est le plus populaire pour une application en analyse directe sur tissu. Je me focaliserai principalement, dans cette introduction et dans la présentation de mes travaux à la description et à l'utilisation de cette source pour les analyses directes sur tissu.

2.2.3.1 Profiling et imagerie MALDI

En 1994, a été proposé par l'équipe de Geraert de directement analyser les neuropeptides de cellules neuronales de mollusques (91). Deux ans plus tard, l'équipe de Sweedler utilisait la même stratégie pour l'analyse de neurones d'invertébrés marins (92).

Enfin en 1997, Caprioli décrit pour la première fois la technique d'imagerie par spectrométrie de masse qui consiste à reporter de manière informatisée l'information d'intensité de chaque valeur de m/z d'intérêt d'un spectre de masse sur une surface analysée (93). Le mode d'analyse en imagerie sur coupe est donc né des développements du MALDI. Depuis son invention, des nombreux progrès ont été faits pour le développement de la méthode, tant sur le plan de la préparation de l'échantillon, que sur les outils informatiques et instrumentaux proposés par les constructeurs pour la réalisation de l'analyse et l'interprétation des résultats (94, 95).

Ces développements, dont je décrirai les divers aspects ci-dessous, ont conduit à l'utilisation de la technique pour de nombreuses applications à la recherche de biomarqueurs et la classification de divers cancers.

2.2.3.2. Principe de l'analyse MALDI sur tissu

Le principe de base de l'analyse MALDI directe sur tissu repose sur les fondements de l'histologie et de la spectrométrie de masse MALDI. Une coupe de tissu de 8 à 20 μ m d'épaisseur est réalisée à l'aide d'un cryostat ou d'un microtome et est placée sur une lame de verre conductrice. Ces lames de verre sont des lames de microscopie recouvertes d'une fine surface conductrice faite d'Indium Tin Oxide (ITO), et permettent de procéder à la fois à des expériences de microscopie optique et à des analyses de spectrométrie de masse. Le tissu est ensuite préparé pour l'analyse MALDI. Quelque soit le mode d'analyse choisi, la solution de matrice MALDI est déposée à même le tissu. Avec l'évaporation du mélange de solvant, et dépendamment de la nature de celui-ci, une certaine quantité des biomolécules-peptides, protéines, lipides- présente au sein de la coupe sera extraite de celle-ci et incorporée au sein du réseau de cristaux de matrice formés. Pour le mode imagerie, le dépôt de matrice doit respecter l'information de localisation des biomolécules au sein de la coupe et être adapté à une analyse point par point afin de permettre une analyse standardisée au niveau de chaque position de la coupe. Il est donc nécessaire que la matrice soit déposée de manière homogène sur la surface d'intérêt à analyser. Le dépôt doit permettre une extraction des composés équivalente entre chaque position à analyser. Cette extraction à une position doit également être indépendante de celle d'une autre position, la délocalisation des composés étant initiée par une extraction avec des larges gouttes de solvant sur de larges zones de tissu. Il existe

plusieurs méthodes de dépôt homogène de la matrice qui permettent de contrôler cette extraction sur la surface de la coupe de tissu, dont je décrirai dans la suite de cette introduction les différentes déclinaisons.

L'échantillon ainsi préparé peut ensuite être dirigé vers la source du spectromètre de masse MALDI pour en effectuer l'analyse. Le faisceau laser irradiera la zone à analyser pour produire des ions des biomolécules en phase gazeuse, qui seront distingués selon leur ratio m/z . Cette discrimination des molécules en fonction de leur masse permet d'en mesurer simultanément leur intensité. L'information de spectrométrie de masse recueillie à un endroit précis de la coupe de tissu représente l'ensemble des biomolécules ionisables à cette position. Cette position et son information moléculaire peut être reportée aux positions de la coupe histologique pour en différencier les profils entre les différents sous types tissulaires.

La **figure 8** résume les différentes étapes de préparation de l'échantillon pour l'analyse MALDI de coupes de tissus, en mode profiling et en mode imagerie à partir d'échantillons tissulaires congelés.

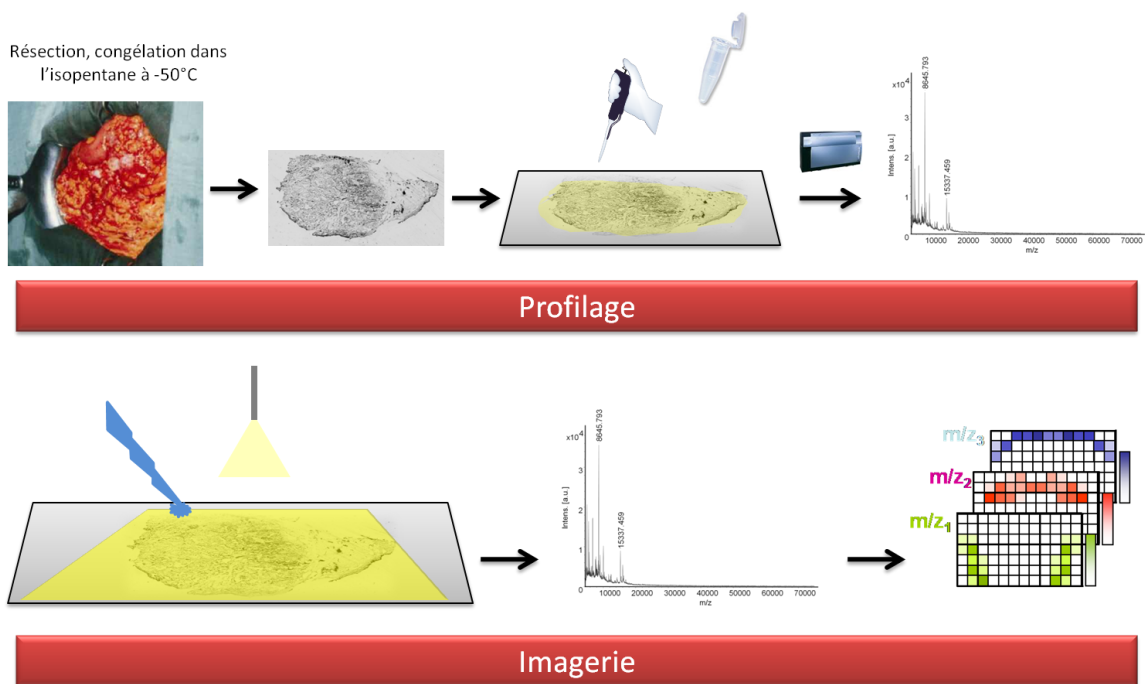


Figure 8: Modes d'application des analyses directes sur coupe

2.2.3.3. Nature de l'échantillon tissulaire

Contrairement à d'autres types d'études en protéomique reposant sur l'utilisation des échantillons tissulaires, la préparation et la conservation du tissu dans le but de garder son intégrité anatomique sont primordiales pour une analyse directe sur coupe. Celui-ci doit être en premier lieu protégé des modifications moléculaires induites par l'environnement telles que l'oxydation ou son contenu intrinsèque comme la protéolyse par les enzymes présents dans le tissu. Aussi, la préservation de l'intégrité structurale du tissu est primordiale pour la localisation cohérente de composés d'un tissu. Les méthodes pour la préservation de l'échantillon utilisées pour les analyses directes sur coupe ont été empruntées à celles existant pour l'histologie. Les principales techniques de préservation de l'échantillon reposent sur la congélation rapide ou sur la fixation chimique.

La première des méthodes consiste à congeler le tissu de la manière la plus rapide afin que l'intégrité cellulaire du tissu puisse être conservée. A des températures entre 0 et -25°C, l'activité cellulaire est ralentie mais existe toujours. C'est en dessous de -40°C que les échanges physicochimiques sont neutralisés. Il faut atteindre une température de -80°C pour pouvoir conserver un tissu à long terme et en conserver son intégrité moléculaire.

Une congélation lente et à faible température conduit en général à la formation de larges cristaux de glace, résultant d'échanges entre les solutions intra et extracellulaires, dont la concentration en sel est différente. Ce phénomène conduit finalement à la destruction complète de la cellule. La congélation doit donc se faire de manière assez rapide pour éviter la formation de ces larges cristaux. Une température trop élevée peut également être à l'origine de la formation de gros cristaux. La congélation doit être donc rapide et faite dans une gamme de température allant de -50 à -80°C. La méthode adéquate utilisée pour la conservation du tissu est donc la congélation dans l'isopentane (2-Methyl Butane) refroidi à -60°C. Ce solvant étant toujours liquide à cette température, il permet une congélation rapide et optimale du tissu. L'échantillon est ensuite conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Les tissus sont ensuite montés pour la réalisation des coupes au cryostat avec de la colle OCT (Optimal Cutting Temperature). Ce type de montage permet d'obtenir des coupes de 5 à 10µM d'épaisseur et permet une analyse d'un panel varié de biomolécules sur une assez large gamme de masse. Celle-ci n'est alors limitée que par les propriétés de l'appareil, quand il est utilisé pour l'analyse d'échantillons complexes.

Un autre type de préservation est la fixation chimique. Le plus souvent, des aldéhydes sont utilisés, qui créent des ponts chimiques (ponts méthylène) entre les protéines. Cela permet de lier ensemble toutes les protéines afin de d'obtenir un maillage moléculaire. Le fixateur le plus communément utilisé dans les laboratoires d'histologie est le formaldéhyde ou formalin, qui agit en liant les protéines notamment par les résidus lysine de celles-ci. En général, ces tissus sont enrobés dans de la paraffine pour en former des blocs. On parle de tissus fixés à la formaline et enrobés dans la paraffine (FFPE pour formalin Fixed and Paraffin Embedded). Cette fixation donne une très grande stabilité aux tissus dans le temps et permet d'en obtenir des coupes très fines, de l'ordre de 3 à 4 µm, avec l'utilisation du microtome. Cependant l'analyse MALDI sur ce type de tissu est rendue très difficile de par les pontages chimiques existants entre les protéines intrinsèques. En effet, le faisceau laser ne permet pas de rompre les liaisons covalentes formées par les ponts méthylène entre les protéines. Le tissu est sous la forme d'un réseau solide de protéines qui ne peut être détruit par le faisceau laser.

Il existe d'autres types de fixations de tissus bien adaptées à une utilisation pour des analyses directes en spectrométrie de masse, basées sur l'utilisation de solvant comme l'éthanol (96) ou de fixateurs n'induisant pas la formation d'un maillage des protéines du tissu

tel que le RCL2 /CS100 (97). Le fixateur PAX gene a également été proposé pour la fixation des tissus pour une utilisation en imagerie MALDI, pour des analyses sur protéines natives autant que sur digestats protéolytique (98). Ces fixateurs présentent l'avantage, en plus de ne pas lier les protéines entre elles, de ne pas être volatiles ni toxiques mais leur utilisation n'est malheureusement pas démocratisée dans les laboratoires d'anatomo-pathologie. En protéomique clinique, ils ne sont donc utilisés que dans les laboratoires qui peuvent se procurer des tissus dans les hôpitaux où ces protocoles pour la préparation des échantillons tissulaires peuvent-être acceptés.

2.2.3.4. Préparation de l'échantillon

Les méthodes de base de préparation des coupes de tissu sont également empreintées aux méthodes de l'histologie classique. Cependant, l'adaptation à la spectrométrie de masse et une analyse moléculaire globale nécessite de préparer l'échantillon de manière à le rendre compatible à la spectrométrie de masse MALDI afin que la détection des biomolécules soit optimale. En ce qui concerne les tissus frais, ceux-ci seront composés de sels qui limiteront une cristallisation optimale de la matrice, d'autre part les protéines n'étant pas incluses dans un maillage moléculaire, leur composition est instable et une fixation est requise pour éviter la dégradation de celles-ci avant de permettre la préparation du tissu à température ambiante sans qu'une dégradation des protéines ne soit observée. De plus, le travail sur tissus frais permet l'accessibilité à une large gamme de biomolécules mais la facilité de détection de molécules de faible gamme de masse en limite généralement la détection des biocomposés de plus haute masse moléculaire. Cela est dû aux propriétés des détecteurs qui équipent généralement les spectromètres de masse MALDI TOF. Ceux-ci sont de type Micro Channel Plate et fonctionnent sur le principe de conversion du courant ionique produit par les ions désorbés, transportés à travers le tube de vol et arrivant au contact du détecteur en un signal électrique mesurable. Le détecteur, une fois activé par un ion de basse masse moléculaire, nécessite une phase de stabilisation à un état d'équilibre pour la détection d'un ion de m/z plus haut. Dans un mélange complexe, les ions de plus faible masse moléculaire arrivant les premiers au contact du détecteur, peuvent parfois, en fonction de leur nombre, saturer celui-ci et en limiter la capacité à détecter des composés de masses moléculaires plus élevées. Des méthodes sont donc nécessaires afin d'adapter la préparation de la manière la plus adéquate à la problématique d'analyse.

Il y a deux manières de fixer un tissu frais qui sont utilisées pour des techniques d'immunohistochimie et peuvent être utilisées pour la préparation des échantillons à analyser en spectrométrie de masse. En premier lieu, la dessiccation est un élément de préparation des coupes acceptée dans tous les laboratoires qui pratiquent l'analyse par spectrométrie de masse directe sur tissu. Elle permet de limiter la dégradation des protéines par les enzymes protéolytiques intrinsèques au tissu. Des solvants tels que l'acétone ou l'éthanol permettent également de fixer de manière efficace les tissus. L'éthanol permet également le retrait efficace des sels de la coupe de tissu qui gênent l'analyse MALDI. Classiquement, des bains de ces différents solvants à des temps déterminés sont effectués afin de procéder aux étapes de fixation/dessalage (99). Des solvants sont également utilisés pour permettre le retrait des composés de basses masses moléculaires. Diverses études ont été réalisées pour connaître leur propriété de fractionnement des composés de la coupe (99, 100). Parmi ceux-ci, le chloroforme apparaît comme le plus adapté pour le retrait des lipides de la coupe, qui sont les composés « parasites » de l'analyse des peptides et des protéines (99). A ce niveau, des traitements plus élaborés faisant appel à l'utilisation de détergents et de solvants permettant de décomplexifier localement les structures tissulaires et cellulaires peuvent être utilisés afin d'accéder à des classes de molécules dont la détection pourrait être masquée par les propriétés structurales ou chimiques globales du tissu (101, 102).

Concernant la préparation des tissus FFPE, de la même manière que pour la préparation en immunohistochimie, les tissus sont coupés au microtome et les coupes déposées sur lames de verre recouverte de polylysine. L'adhésion des coupes se fait par dépôt de la coupe sur une goutte d'eau qui sera ensuite chauffée jusqu'à évaporation complète. Comme mentionné précédemment, il est nécessaire d'adapter des méthodes spécifiques pour le travail de spectrométrie de masse sur le maillage moléculaire dont est constituée la coupe de tissu. Ces techniques sont les techniques d'antigen-retrieval classiquement utilisées dans les laboratoires d'anatomo-pathologie. Celles-ci peuvent consister à soumettre le tissu à de fortes pressions, à de fortes températures (103), à des micro-ondes (104-106), en présence ou non de diverses solutions telles que le SDS (107) ou un mélange d'hydroxyde de sodium et de méthanol (108, 109). Les coupes peuvent aussi être soumises à un chauffage par microonde dans une solution de tris-EDTA à pH9 (110). A ce jour, il est reconnu que l'ajout d'une solution d'acide citrique à pH6 associée au chauffage de celle-ci comme traitement de la coupe de tissu améliore significativement la qualité, la richesse et l'intensité du signal pour

des analyses directes en spectrométrie de masse (111). Pour des analyses en protéomique, il est nécessaire de procéder à la digestion enzymatique de la coupe afin de réduire le maillage tissulaire à un digestat de protéolyse, généralement par la trypsine, enzyme largement démocratisé pour les analyses par spectrométrie de masse.

2.2.3.5. Analyse d'identifications sur tissus

Comme toute analyse protéomique, il y a deux choix possibles pour faire l'analyse des protéines sur tissu. Les deux voies d'investigations connues sont les analyses en top down et en bottom up, schématisées dans la **figure 9**. La stratégie top down consiste en l'analyse de protéines natives. Cette approche est très compliquée quand elle est appliquée à un mélange complexe tel qu'un tissu. L'identité d'une protéine est toujours déterminée par la fragmentation de celle-ci et l'évaluation des fragments produits. En top-down, cela peut consister en l'analyse des séquences des extrémités fragmentées de la protéine ou en l'analyse des fragments sur toute la longueur de la protéine. L'analyse en bottom up consiste quant à elle à la digestion protéolytique préalable du mélange protéique, et à l'analyse des peptides de digestion par fragmentation et détermination de la séquence de ceux-ci (112).

Dépendamment du type d'échantillon choisi, du but recherché pour l'analyse et des limitations de la méthode, un choix judicieux de la voie d'investigation devra être fait. En effet, comme mentionné précédemment, l'utilisation de tissus FFPE pour la recherche de biomarqueurs de pathologies ne permet que l'utilisation de la voie bottom up. Les deux types d'approche sont utilisables sur des tissus frais. Cependant, en top down, il n'existe à ce jour pas de méthode pour la fragmentation des ions monochargés de protéines obtenues avec la source MALDI sur toute leur longueur. Le choix de la matrice est également très important pour le choix de l'analyse. L'HCCA sera donc très adéquat pour les analyses bottom up et la fragmentation de peptides de digestion tryptique. Pour l'analyse top down, la matrice 1,5 DiAminoNaphtalen (1,5 DAN) permet la fragmentation des extrémités C-terminales des protéines et la détermination de leur séquence. Cette matrice pourrait donc être envisageable pour une analyse top-down des protéines tissulaires. Son utilisation fera l'objet d'une partie des développements présentés dans ce manuscrit.

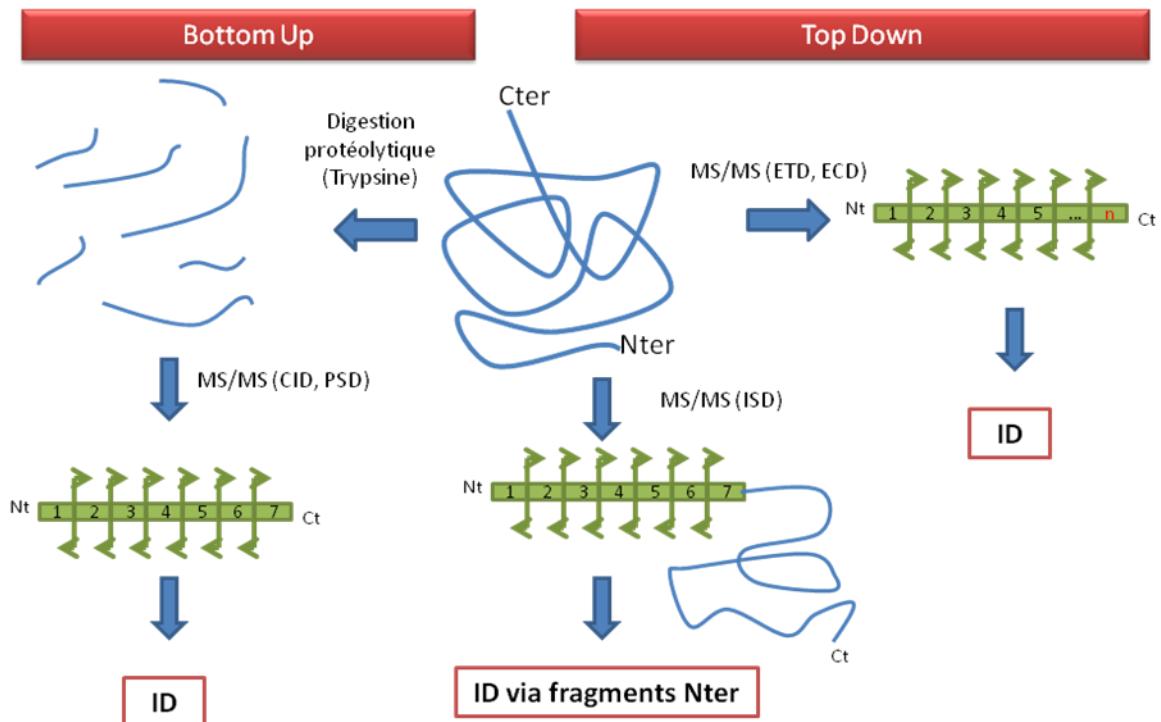


Figure 9: Modes d'analyses top-down et bottom up en protéomique.

2.2.3.6. Choix et dépôt de la matrice

Choix de la matrice

Pour chaque problématique d'analyse, un choix judicieux de la matrice utilisée doit être réalisé, de la même manière que pour des analyses MALDI classiques. Cependant, un certain nombre de développements a été réalisé pour la fabrication de matrices « modifiées » pour une amélioration du signal obtenu sur coupe. Le solvant utilisé pour la dissolution de cette matrice apparaît être un élément fondamental dans la préparation de l'échantillon. Les seuls éléments détectés par analyse directe sur coupe seront les éléments qui auront été les mieux extraits de la matrice tissulaire et incorporés dans les microcristaux de matrice formés après évaporation du solvant.

Conventionnellement, la matrice MALDI classique utilisée pour l'analyse des peptides sera l'Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid ou HCCA. Pour l'analyse des protéines, l'acide sinapinique (SA) est utilisé. Enfin, pour l'analyse des lipides, la DHB (DiHydroxyBenzoicAcid) ou la DHAP (Di Hydroxy Aceto Phenon) sont classiquement

utilisées. Les matrices utilisées pour l'analyse des autres catégories de biocomposés sont reportées dans le **tableau 1**.

Les principaux développements pour la fabrication de matrices plus adaptées à l'analyse sur coupe consistent à l'amélioration chimique de ces matrices. Ainsi, des matrices ioniques ont été développées pour une analyse sur coupe de tissu (113). Ces matrices sont des sels organiques formés par réaction acido-basique d'un mélange équimolaire de l'acide qui forme la matrice et d'une base organique. Des matrices ioniques de divers types ont été créées pour la détection améliorée sur coupe des différentes classes de composés tels que les peptides avec l'HCCA/ANI (Anilin), les protéines avec la SA3/AP (Acetyl Pyridin). Les matrices ioniques, en fonction de la base choisie peuvent être sous une forme solide ou liquide. Certaines matrices ioniques liquides fabriquées sur une base de DHB telles que la 2,5DHB/Py (Pyridin), 2,5DHB/3-AP (Amino Pyridin), 2,5DHB/ANI se sont révélées être des matrices efficaces pour l'analyse de lipides (114). L'utilisation de matrices ioniques pour l'analyse moléculaire sur coupe présente deux principaux avantages, le premier étant de permettre une détection bien plus sensible des composés : les signaux MS étant en effet bien plus intenses avec l'utilisation de matrices ioniques par rapport à l'utilisation de matrices classiques. Le deuxième avantage apporté par les matrices ioniques est l'uniformité de dépôt. Cette caractéristique est un atout majeur pour une utilisation en mode imagerie. La cartographie moléculaire nécessite en effet que les cristaux de matrice soient les plus petits possibles et le dépôt le plus égal possible entre les points d'analyse sur la surface de la coupe. Un autre avantage de ces matrices est leur stabilité dans le vide. La séquence d'analyse par imagerie MALDI pouvant durer jusqu'à plusieurs heures, il est nécessaire que le dépôt entre le premier point d'analyse et le dernier puissent rester intègres jusqu'à la fin de l'analyse.

Dépôt de la matrice

Le dépôt de la matrice est l'étape cruciale de la préparation de l'échantillon qui doit être réfléchi de la manière la plus adaptée possible au but recherché dans l'analyse. Le mode profiling ou imagerie détermine en premier lieu du mode de dépôt du mélange solvant/matrice qui sera choisi pour l'extraction et la cocristallisation des biocomposés de la matrice. En analyse directe sur coupe de tissu, le volume de matrice déposé en une seule étape est un facteur très important de l'analyse. L'extraction de composés sur une coupe de tissu repose

sur le principe d'extraction solide-liquide. La nature du solvant ainsi que son volume sont des facteurs très importants dans ce processus. Plus le volume de solvant déposé est grand, plus importants seront les échanges entre la phase solide de la coupe et liquide de la goutte de solution de matrice jusqu'à saturation de la solution déposée en soluté. Ainsi, une plus grande concentration de composé se retrouvera extraite de la coupe et l'analyse MALDI sera en conséquence plus prolifique. La détection des biocomposés d'un tissu par analyse est donc inféodée à un équilibre entre la résolution recherchée et la qualité et la richesse du signal obtenu. Il existe une balance entre la taille des gouttes et donc le volume de matrice déposé sur la surface de la coupe, qui déterminera la précision de la localisation moléculaire. Le mode profiling consiste à mettre en évidence une signature du contenu global en protéines d'une surface de largeur assez importante. Cette méthode est assez bien adaptée à la comparaison de deux zones bien différenciées d'une coupe de tissu. Dans des applications cliniques, bien souvent les parties malignes et bénignes sont différenciées sur de larges zones tissulaires. Dans ce contexte, une simple analyse différentielle est suffisante pour la découverte de marqueurs tissulaires de pathologies. Un dépôt manuel de matrice, d'un volume adapté à la surface du tissu à analyser à l'aide d'une micropipette est alors le moyen le plus simple et le plus approprié pour ce type d'investigation. L'avantage de l'approche est de déposer un grand volume de matrice et ainsi de faire pencher la balance résolution/signal en faveur de la qualité et de la richesse spectrale.

En mode imagerie, le principe de la balance résolution/signal s'applique également. Cependant, pour obtenir une extraction des composés et une cartographie de ceux-ci standardisés sur la surface de la coupe, le dépôt de matrice doit être réalisé de manière absolument homogène, donc de façon automatisée. Il doit être réalisé de manière à respecter la localisation moléculaire des composés à détecter sur la surface de la coupe. La méthode choisie doit donc être adaptée à la résolution voulue pour la réalisation de l'image. Il existe deux principes de dépôt automatisé de la matrice : le recouvrement par spray et le micro dépôt. Au début de l'utilisation de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI, les sprayers prévus pour une utilisation pour la chromatographie sur couche mince étaient utilisés. Cette méthode est peu coûteuse et simple d'utilisation, ce qui en fait encore à ce jour une méthode de dépôt de matrice de choix pour des équipes qui débutent des applications d'imagerie par spectrométrie de masse. Cependant cette méthode de dépôt apparaît peu reproductible. Des systèmes de dépôt complètement automatiques sont alors recommandés

pour une standardisation de la méthode. Les microspotters commerciaux permettent de déposer des gouttes de 100 à 200 μL sur la surface du tissu et sur plusieurs cycles, de sorte que quelques nL de solution finale sont déposés sur chaque position à analyser. Le fonctionnement des deux microspoteurs commercialisés repose sur la formation de gouttes à partir d'un quartz piezo électrique soumis à des vibrations (Chip 1000 Shimadzu) ou sur l'utilisation d'ondes acoustiques (Portrait 630 Labcyte). Le nébulisateur commercial, ImagePrep fonctionne par la vibration d'une lamelle percée de micro-orifices soumise à vibration. La solution de matrice, au contact de cette lamelle en sortira sous forme de microgouttelettes qui tomberont sur la surface de la coupe. Un autre appareil vendu par Leap Technology permet une nébulisation d'un spray chauffé afin de permettre une évaporation plus rapide du solvant. Une évaporation plus rapide est plus adaptée pour une préparation rapide de l'échantillon. Ces appareils de spray déposent en plusieurs étapes une fine couche de matrice sur la surface de l'échantillon et une meilleure extraction des composés. La **figure 10** schématise les différents modes de dépôt de matrice et les différents résultats obtenus après dépôt.

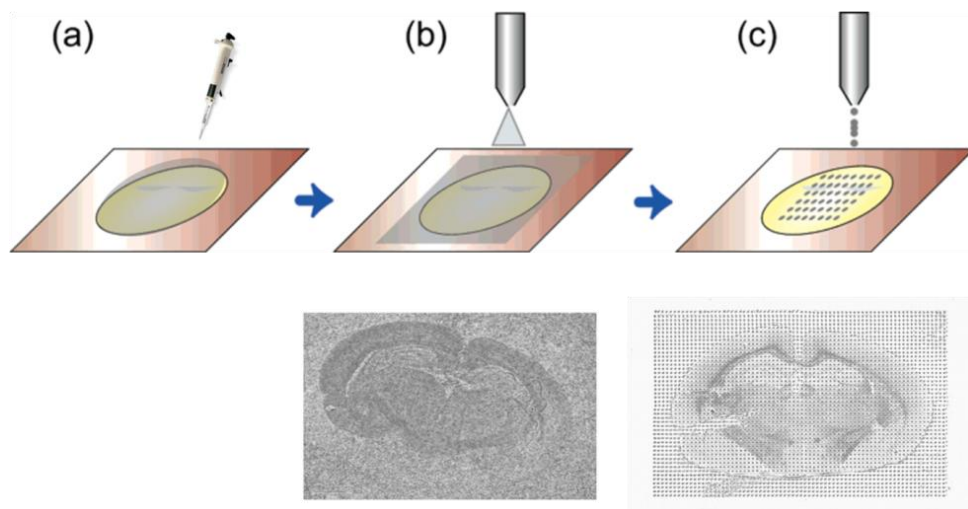


Figure 10: Différents modes de dépôt de la matrice : (a) manuel, (b) automatisé par spray, (c) automatisé par dépôt de nanogouttelettes et résultats obtenus.

Les appareils permettant un dépôt de matrice par spray évitent au maximum la délocalisation de la matière dans le tissu et permettent une résolution de l'image optimale. Cependant, ils ne permettent pas une extraction optimale de celle-ci. Les appareils fonctionnant sur la base du microdépôt limitent la résolution de l'image à la distance entre chaque spot de dépôt mais permettent une extraction bien améliorée par rapport à la méthode

de spray. De plus, des réglages de ces appareils permettent de réduire le temps des cycles de dépôt ou la partition de la zone à préparer en plusieurs sous zones afin que l'humidité de chaque spot soit préservée durant toute la durée du dépôt et donc d'éviter un phénomène qui se produit avec les méthodes par spray qui est la perte d'efficacité d'extraction après les premiers cycles de dépôt. En effet, la diffusion de la matière dans le tissu étant importante si un volume important de solution est déposé en spray. Il est important de partitionner le dépôt de la matrice en cycles et de contrôler le séchage intégral de celle-ci entre chaque cycle. Bien qu'une humidité puisse être préservée entre chaque cycle du dépôt, celle-ci ne reste que très limitée. Le phénomène pouvant être observé est alors celui du masquage du signal par la matrice. Dépendamment de l'efficacité d'extraction du mélange matrice/solvant lors des premiers cycles de dépôt, les cycles de dépôt suivant peuvent, plutôt que de poursuivre celle-ci, ne permettre que le dépôt de couches de matrice sur d'autres couches de matrice. Les dernières couches de matrice n'auront alors pas incorporé les biocomposés du tissu. Un choix judicieux est alors à faire par le manipulateur en fonction de ses objectifs analytiques de résolution ou d'extraction des composés, les avantages et les inconvénients des différentes machines disponibles étant toujours balancés entre le niveau d'extraction des composés de différentes classes et la résolution accessibles grâce à leur utilisation. Le **tableau 5** résume les différentes propriétés des instruments permettant le dépôt de matrice sur les coupes de tissu.

Instrument	Sociétés	Mode de dépôt	Taille moyenne des gouttes déposées
ImagePrep	Bruker	Micro nébulisation vibrationnelle	<50 µm, moyenne 25µm
Chemical inkjet printing CHIP1000	Shimadzu	Micro-dépôt par système piézo-électrique	150 µm
TMiD	LEAP Technologies	Micro nébulisation par Nano-pompes	<50 µm
MALDI-spotter Suncollect	SunChrom	Micro nébulisation pneumatique Micro-dépôt par capillaire	<50 µm 200 µm
Portrait™ 630 Reagent Multi-Spotter	Labcyte Inc	Ejection acoustique	200 µm
Spoetnik	Siliflow	Micro-dépôt par capillaire	300-600µm

Tableau 5: Instruments permettant le dépôt de matrice sur coupes de tissus.

2.2.3.7. Acquisition des données MALDI, reconstruction des images

Acquisition des données

Les caractéristiques de la méthode ont évolué dans le temps avec les caractéristiques des instruments commercialisés à cet effet. Une avancée majeure en imagerie MALDI a été l'amélioration des caractéristiques des lasers. La vitesse d'activité de ceux-ci est déterminante sur la vitesse d'analyse et le temps d'obtention d'une séquence d'imagerie. Les premiers appareils de spectrométrie de masse MALDI étaient équipés de lasers N₂ permettant la répétition de 3 à 20Hz. Progressivement des lasers plus robustes de type Nd:Yag ont remplacé les lasers N₂ pour une utilisation de haut débit de 200Hz à 2KHz. Les lasers des appareils de la marque la plus populaire pour une utilisation en spectrométrie de masse, Bruker, sont équipés de cette technologie de lasers, sous la marque SmartBeam. La majorité des appareils équipant encore actuellement les laboratoires d'imagerie MALDI possèdent des lasers de répétition de 200Hz. Les nouvelles générations d'appareils permettent aujourd'hui d'accéder à des répétitions de 5kHz.

Une autre caractéristique importante des lasers pour une application en spectrométrie de masse est la taille du faisceau laser au contact de la coupe de tissu. La largeur minimale de celui-ci détermine la résolution maximale possible d'obtenir. Celles-ci se situent à des valeurs entre 25 et 50µm pour les appareils utilisés pour l'imagerie. Des développements au niveau de la focalisation du faisceau ont permis d'atteindre ces propriétés. Il est important de noter que la diminution de la taille du faisceau laser et de la surface d'analyse entraîne une perte de l'intensité du signal important. Un montage optique réalisé par l'équipe du Pr B. Sprengler, associé à l'utilisation d'un analyseur Orbitrap a permis d'atteindre une résolution de 5 µm mais l'application de cette méthode dénommée SMALDI-MS (pour Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry) ne se limite qu'à l'analyse des lipides.

Aujourd'hui, l'application d'imagerie MALDI est celle qui requiert la plus grande robustesse et les caractéristiques les plus performantes au niveau instrumental. Les développements des constructeurs suivent donc les tendances des nouvelles problématiques. On peut de manière réaliste imaginer une vitesse d'acquisition des images encore augmentée au cours des prochaines années. Un développement du système de mouvement continu du faisceau laser a déjà été proposé pour permettre une analyse MALDI plus rapide (115).

Les logiciels pour l'histologie moléculaire proposent également un mode « profiling automatisé » afin de standardiser l'acquisition de données provenant de tissus préparés manuellement. Ce mode permet d'obtenir les informations moléculaires d'un tissu à très haut débit. L'automatisation de la méthode permet, en protéomique clinique, une analyse comparative de tissus tout à fait correcte. Il permet également de comparer de très larges cohortes de tissus en un temps très restreint. Cela représente un avantage certain pour la recherche de biomarqueurs du cancer si l'on considère qu'une acquisition en imagerie MALDI peut prendre jusqu'à plusieurs heures, et que les surfaces pathologiques à analyser sont en général très larges. De plus, la découverte d'un marqueur pertinent nécessite de le retrouver dans de larges cohortes.

La **figure 11** (116) récapitule les différentes étapes de préparation de l'échantillon, acquisition des données et les différents modes d'analyse MALDI directe sur tissu.

Enfin, dans le **tableau 2** (117) sont répertoriés les appareils disponibles pour les analyses d'imagerie de profiling, leurs caractéristiques et celles des données générées et des logiciels pour leur exploitation.

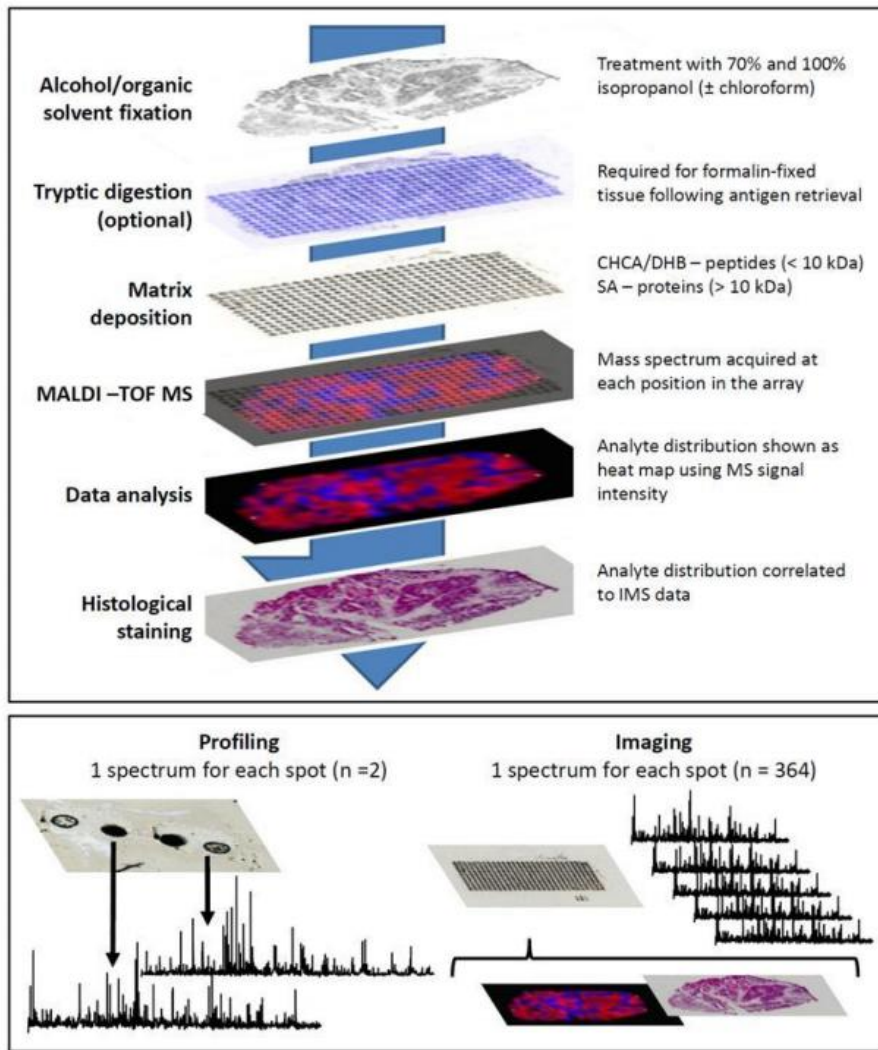


Figure 11: Etapes de préparation et d'analyse des tissus pour les modes profiling et imagerie.(116)

Instrument	Société	Type	Laser	Gamme de Masse	Logiciel	Format des données
5800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer	AB Sciex	TOF-TOF	Nd-YAG 1000 Hz	full	4800 Img, TissueView	Analyze
4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer	AB Sciex	TOF-TOF	Nd-YAG 200 Hz	full	4800 Img, TissueView	Analyze
Autoflex IV	Bruker	TOF-TOF	Smartbeam II 1 KHz	full	flexImaging, CreateTarget, AnalyzeThis!, BioMap	Analyze
UltrafleXtreme	Bruker	TOF-TOF	smartbeam-II 1000 Hz	full	flexImaging, CreateTarget, AnalyzeThis!, BioMap	Xmass, XML
Solarix MI	Bruker	hybrid FTMS	smartbeam-II 1 kHz	100 - 10 kDa	flexImaging, BioMap	Xmass, XML
AXIMA QIT™	Shimadzu	ion trap TOF	N2 50 Hz	to 20 kDa	Axima2Analyze	Analyze
AXIMA Assurance	Shimadzu	TOF	N2 50 Hz	to 500 kDa (linear)	Axima2Analyze	Analyze
AXIMA Confidence AXIMA Performance	Shimadzu	TOF TOF-TOF	N2 50 Hz	to 500 kDa (linear) to 80 kDa (reflectron)	Axima2Analyze Axima2Analyze	Analyze Analyse
MALDI LTQ XL	Thermo Fisher Scientific	Ion trap	N2 60 Hz	50 – 4000 Da	LTQ Tune, ImageQuest	RAW, imzML
MALDI LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific	ion trap – Orbitrap hybrid	N2 60 Hz	50 – 4000 Da	LTQ Tune, ImageQuest	RAW, imzML
MALDI SYNAPT G2 HDMS	Waters	Q-IMS-oaTOF	Nd-YAG 1 kHz	to 40 kDa	MassLynx, BioMap	XML
MALDI SYNAPT G2 MS	Waters	Q-TWave-oaTOF	Nd-YAG 1 kHz	to 40 kDa	MassLynx, BioMap	XML

Tableau 2 (117): Instruments actuels principalement utilisés pour l'imagerie MALDI et leurs caractéristiques (liste non exhaustive).

2.2.3.8. Analyse des données pour des applications en protéomique clinique

L'imagerie et le profiling par spectrométrie de masse, pour des applications dans la recherche de biomarqueurs de pathologies, génèrent une quantité de données très importantes. Ces données doivent être intégrées et interprétées dans une problématique d'analyse et de recherche spécifique. L'information spectrale peut être résumée à l'intensité relative des rapports m/z des éléments détectés dans le mélange complexe de protéines qu'est le tissu. La recherche de biomarqueurs consistera donc à comparer la totalité des informations contenues dans un groupe de spectres par rapport à un autre groupe de spectres. Les différences d'intensité des pics de quelques m/z contribueront à la différenciation globale des groupes d'information. Extraire cette information est quasi impossible à l'œil nu et requiert l'utilisation d'outils adaptés. Il existe plusieurs options pour la comparaison d'informations spectrales, empreintées aux outils de statistique. On peut mentionner parmi ces outils l'analyse discriminante linéaire, les algorithmes génétiques et les analyses en composante principale. La puissance de ces outils est mise en évidence de manière ultime avec les classifications par Support Vector Machines (SVM) qui utilisent les informations de plusieurs pics de m/z pour la discrimination de la nature d'un tissu par rapport à un autre. Ces « classificateurs statistiques » de données ont été utilisés pour l'analyse directe de coupes de cancer de la prostate. Ils ont permis de différencier des tissus cancéreux de non cancéreux avec une sensibilité de 85,21% et une spécificité de 90,74%. Ces classifications ont pu être réalisées à partir de l'évaluation de l'intensité de 22 peptides et protéines(118). Ils ont également pu être utilisés pour l'analyse des puces de tissu (TMA, tissue micro array). Les tissus micro arrays sont des microéchantillons tissulaires de multiples patients disposés sur une même lame. Les tissus FFPE ne pouvant être utilisés qu'en analyse bottom up, il a été possible, pour l'équipe de Groseclose et coll. de procéder à la digestion de 112 tissus de cancers de poumon et à la classification de ceux-ci sur une base de 73 peptides tryptiques, avec une sensibilité de 97,9% pour le type adénocarcinome et de 98,6% pour le type cancer à cellules squameuses (110).

En 2010, l'équipe du Pr. A. Walsh et coll. a réussi avec l'utilisation de tests statistiques à mettre en place une classification précise de tissus du cancer de l'estomac, en se basant sur une classification préalable par un biomarqueur connu du cancer du sein, le récepteur Her2 (119) (**figure 12**). Dans ce type d'analyse statistique, un lot « training » de données est utilisé,

contenant les échantillons tissulaires de patients positifs à un marqueur découverts par immunohistochimie, et un autre de quantité équivalente négatifs à ce même marqueur. Des analyses par spectrométrie de masse sont ensuite réalisées sur chacun de ces tissus. En utilisant ce jeu de données, un modèle de prédiction de la présence du marqueur peut être établi en fonction de la présence ou non de certains pics de m/z donnés entre les tissus et de leur intensité, grâce à l'utilisation de divers tests statistiques. Un lot d'échantillons dit « test » équivalent est alors utilisé pour vérifier la fiabilité du modèle élaboré. Le principe mis en application est présenté dans la **figure 12**. Dans l'étude de l'équipe d'Axel Walsh (118), l'efficacité de prédiction du modèle a également été vérifiée sur un autre type de pathologie dont Her2 est également le marqueur : le cancer de l'estomac.

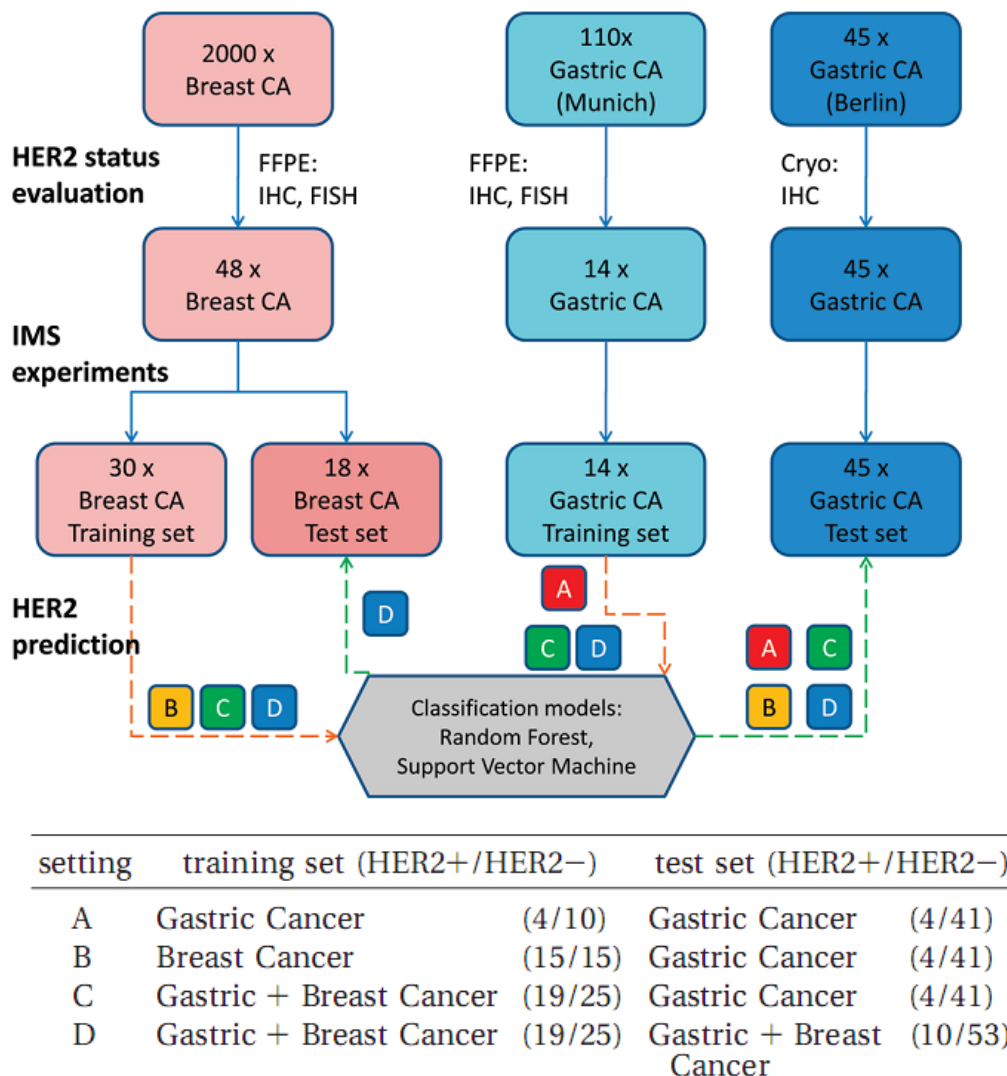


Figure 12: Utilisation de calculs statistiques pour l'élaboration de profils moléculaires de tissus HER2+(118)

Une étude approfondie a permis la découverte d'une signature du statut Her2+, dans le contexte du cancer du sein associée à ce modèle de classification, basée sur 7 protéines avec une sensibilité de 83% et une spécificité de 92% (120). Une des ces protéines correspondant à un pic de m/z 8404, a pu être identifiée, grâce à des expériences complémentaires d'extraction de protéines sur tissu, et de LC-MS/MS. Cette protéine est la cystéine-rich intestinal protein 1. La **figure 13** montre un exemple du profil protéique obtenu pour la différenciation des tissus.

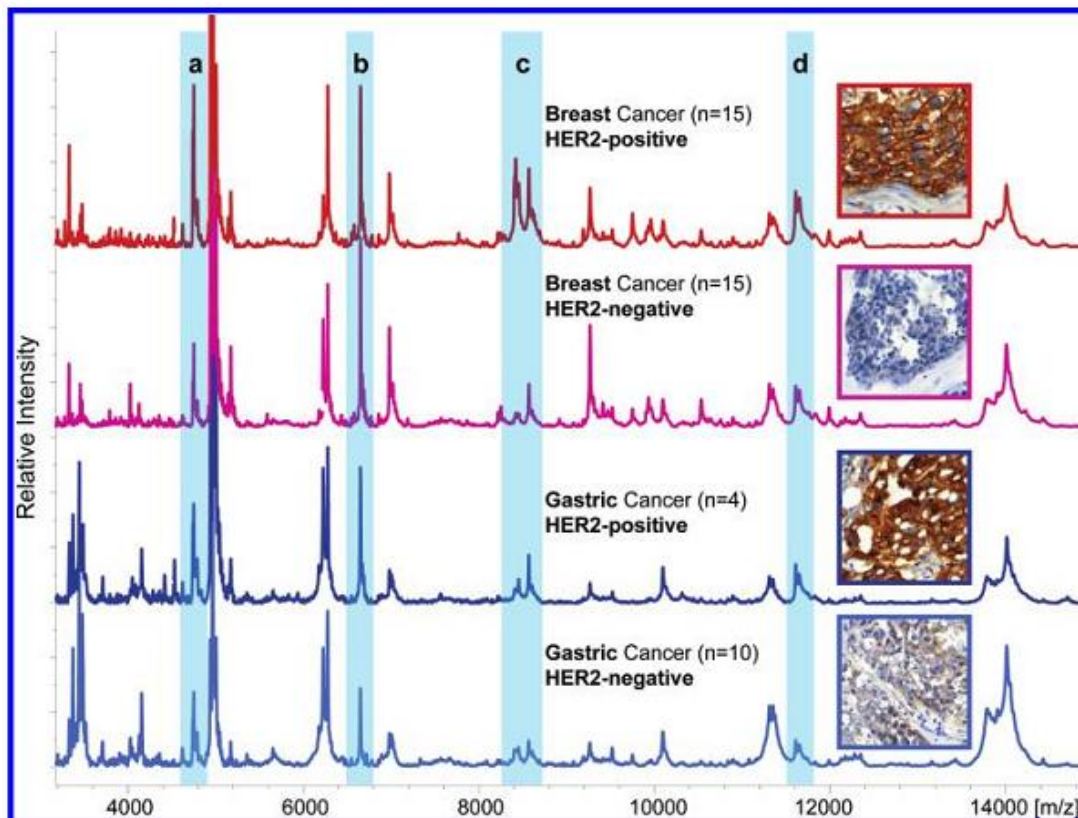


Figure 13: Profil moléculaire discriminant des tissus Her2+(118)

L'utilisation de tests statistiques associés à des expériences de spectrométrie de masse MALDI sur tissu permet également de donner une information complémentaire à l'expertise anatomopathologique. L'information de quantification relative précise des composés d'un tissu apportée par une analyse du tissu permet en effet de donner plusieurs dimensions additionnelles à la connaissance des propriétés du tissu. L'importance de cette information a bien été mise en évidence par l'équipe de Caprioli en 2010 (121).

Des tests statistiques dont les «Support Vector Machine» ont ici été utilisés pour la comparaison des différents sous types de profils moléculaires de biopsies de cancer du rein, composés chacun d'une partie cancéreuse et d'une partie saine. La **figure 14** montre le type

de tissu et la limite entre la zone pathologique et la zone saine déterminée par l'anatomopathologiste. Une analyse par spectrométrie de masse a permis l'analyse moléculaire du tissu, en passant par les différentes zones de celui-ci. Un test, initialement destiné à l'analyse de l'information contenue dans les puces à ADN ou ARN (les SAM pour *Significance Analysis of Microarrays*) a permis de comparer indépendamment l'information moléculaire contenue dans chaque point d'analyse. Ainsi, il a pu être déterminé que l'information contenue de part et d'autre de la limite entre les tissus sains et cancéreux contenait des groupes de protéines dont la quantité était augmentée ou diminuée autour de cette zone. Par contre, d'autres protéines étaient présentes autour d'une zone qui n'avait pu être différenciée par les anatomo-pathologistes. La représentation de cette zone est illustrée dans la **figure 14**. Dans cette zone intermédiaire à la zone normale et la frontière, il a été détecté que la quantité de protéines impliquées dans le transport des électrons dans la mitochondrie était diminuée, mettant en évidence un métabolisme plutôt basé sur la glycolyse plutôt que la phosphorylation oxydative dans les cellules bordant la tumeur. Ces marqueurs pourraient donc être considérés pour la détection d'un mécanisme de progression de la tumeur (122, 123). Cette approche est à prendre particulièrement en considération pour les cas pathologiques où le retrait de tissu durant la chirurgie est limité. Il est parfois difficile d'avoir une idée précise de la situation de la frontière entre le tissu sain et le tissu cancéreux. Pour le cancer du sein par exemple, la résection chirurgicale se limite au retrait de tout ou partie des lobules affectés. Depuis plusieurs dizaines d'années, d'énormes progrès ont été réalisés au niveau chirurgical pour limiter au maximum le niveau de « scarification » des patientes associée au retrait des tissus cancéreux. L'association de ce type d'analyse moléculaire à l'analyse histologique extemporanée pourrait en effet affiner les décisions prises par le chirurgien en cours d'opération.

Au vu de ces résultats, on comprend bien l'utilité d'adapter les outils statistiques à l'analyse moléculaire sur tissu afin d'en révéler l'information, qui ne serait pas visualisable à l'œil nu.

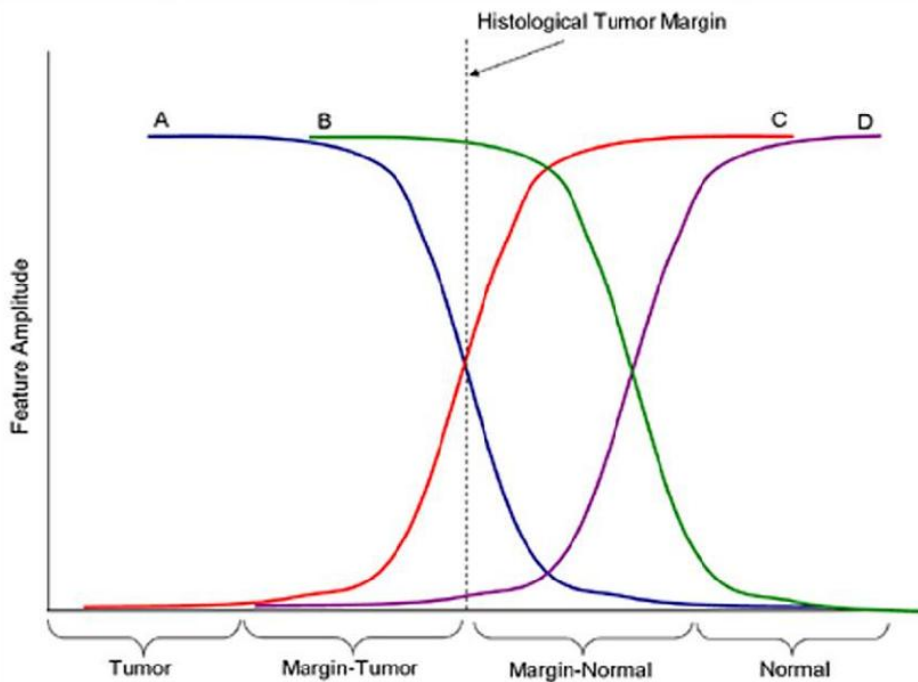
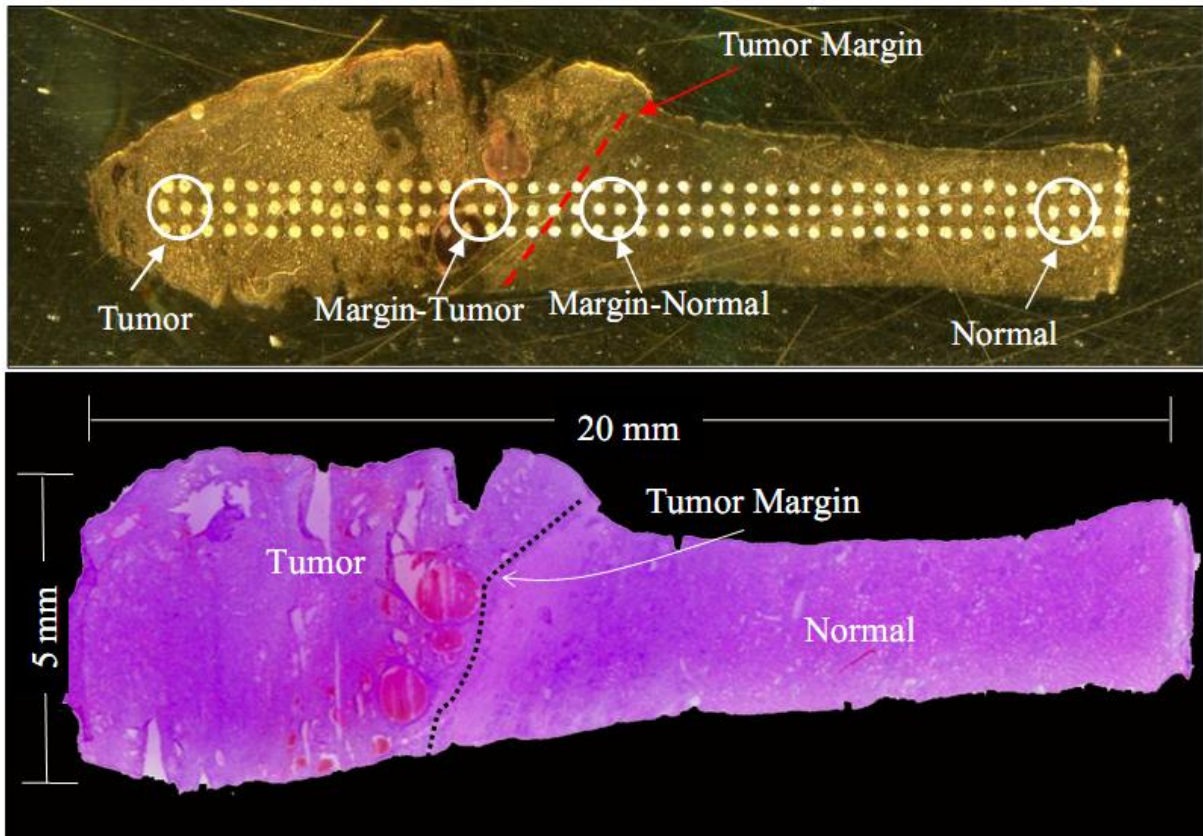


Figure 14: Discrimination de sous types moléculaires autour des frontières tissu sain/cancéreux par calcul statistique(120).

Un des outils les plus populaires utilisé en analyse moléculaire sur tissus est l'analyse en composante principale. Cet outil, intégré à des logiciels intuitifs, permet de manière accessible, de comparer la complexité de l'information d'un groupe de spectres par rapport à un autre groupe de spectres. La **figure 15** montre le principe de classification de l'information spectrale. En composante principale, l'information contenue dans un spectre est une information multidimensionnelle où chaque pic de m/z donné représente une dimension. L'intensité de chaque pic peut être alors placée sur une échelle de valeurs de cette dimension. Par exemple, si l'on considère un spectre de masse composé de trois pics, l'intensité de chacun d'entre eux peut être placée sur chacune des dimensions d'un espace tridimensionnel. Chaque spectre d'un groupe pourra alors être représenté par un point dans cet espace 3D.

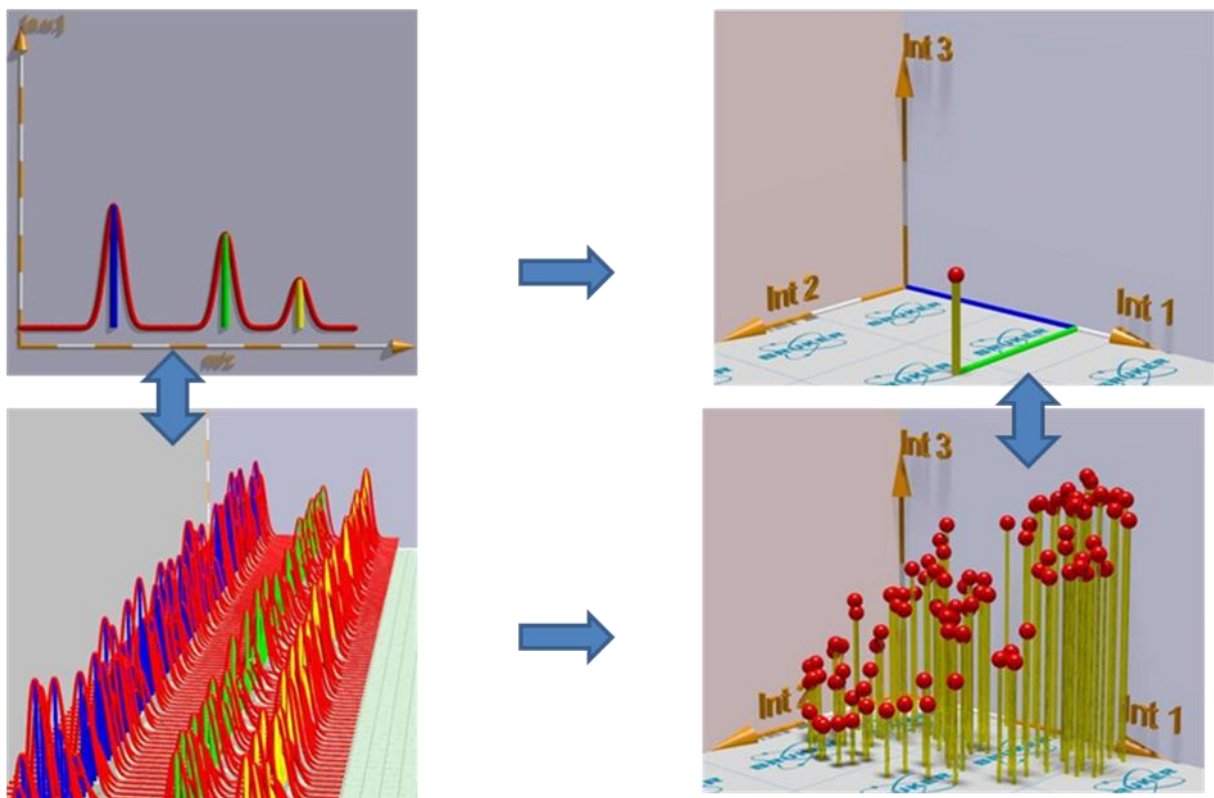


Figure 15: Représentation tridimensionnelle de l'information d'un spectre composé de 3 pics. (Illustrations du logiciel Bruker Clinprotocols)

Le fonctionnement de l'analyse par composante principale est résumé dans la **figure 16**. Un nuage de points est obtenu dans un espace tridimensionnel. Ce nuage de points possède une certaine forme, représentative des variances moléculaires présentes au sein du groupe de spectres analysés. Le calcul de l'analyse en composante principale consiste à

l'évaluation de ces variances pour en déterminer les principaux axes. Ces axes représenteront les composantes principales de variance du groupe de spectres analysés. Il existe au maximum trois axes de composantes, qui forment les dimensions d'un espace tridimensionnel afin de permettre une représentation visuelle des variances. La première composante principale (PC) constituera l'axe où la variance sera la plus importante, la deuxième correspond à celui où la variance sera encore importante mais moindre par rapport à la première dimension. Enfin la troisième PC sera l'axe où la variance sera la moins importante. Il est important de noter que l'exemple donné est celui d'une situation où un spectre n'est composé que de 3 pics, or l'information spectrale est bien plus complexe. Pour un groupe de spectres de n pics, le calcul d'analyse en composante principale est donc réalisé pour la simplification des n dimensions en un nuage de spectre en trois dimensions. L'analyse en composante principale permet donc une simplification de l'information spectrale en un point qui pourra être distingué d'autres spectres par sa distance avec ceux-ci. Elle permet de donner une réponse rapide sur la similarité d'une information moléculaire globale par rapport à une autre. Il est alors possible d'extraire du calcul les facteurs (les dimensions) qui sont responsables de la discrimination d'un spectre par rapport à un autre. En analyse différentielle de tissus pour des problématiques cliniques, les pics de certains m/z , qui seront à l'origine de cette discrimination représenteront donc les marqueurs potentiels de la pathologie.

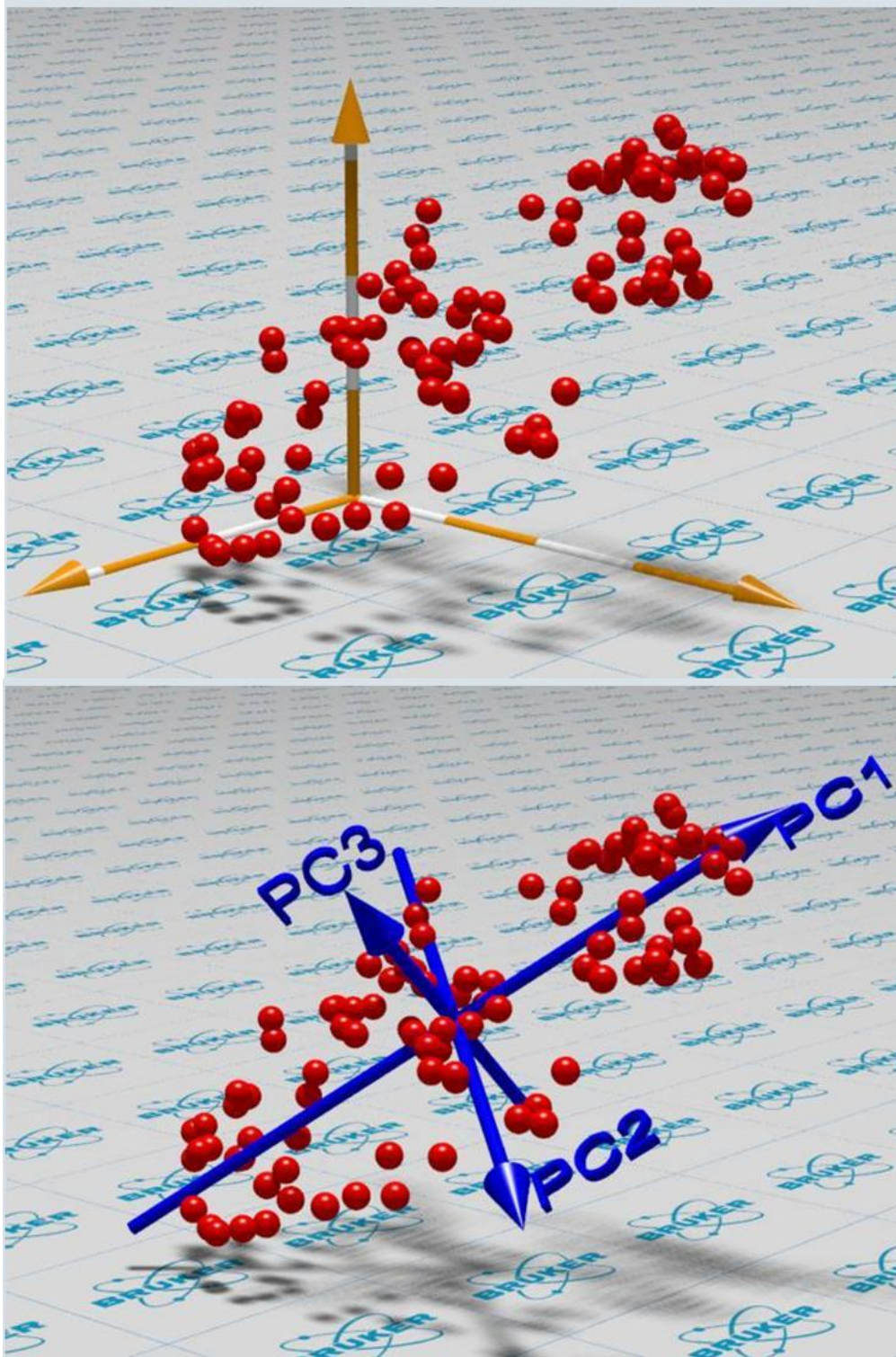


Figure 16: Mode de fonctionnement de l'analyse PCA. (Illustrations du logiciel Bruker Clinprotocols)

A partir de la classification de l'information par PCA, il est également possible de procéder à la classification hiérarchique des spectres qui permet de regrouper les spectres entre eux par ordre de similitude. Le résultat obtenu est celui d'un dendrogramme tel que ceux

que l'on peut obtenir avec une classification phylogénétique. Deux spectres très proches seront reliés entre eux. Les comparaisons ultérieures se feront ensuite par comparaison de ces groupes de spectres avec d'autres groupes de spectres ou d'autres spectres isolés. Des groupes entiers de spectres peuvent ainsi être différenciés entre des tissus très différents. Si des sous types de tissus sont différenciables au sein d'un tissu ou que des variations moléculaires existent, il sera possible de s'en rendre compte par clustering hiérarchique. Des sous divisions seront alors visibles au sein des branches principales du dendrogramme. Ce type de classification est possible avec les spectres d'une même image afin de différencier les zones et sous zones histologiques au niveau histologique. Il existe à ce niveau plusieurs méthodes pour la classification hiérarchique des distances.

2.2.3.9. Analyses MALDI directes sur tissu et cancer

L'approche d'analyse directe sur tissu a été appliquée à de nombreuses investigations en recherche sur le cancer. Diverses pathologies ont été utilisées comme modèles d'application de la méthode dans le domaine de la recherche de biomarqueurs.

L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI a pu être utilisée pour l'étude de tumeurs du cerveau. Plusieurs marqueurs ont pu être localisés à des zones différentes de la tumeur, révélant leur implication dans différents mécanismes de tumorigénèse (124).

L'utilisation de l'outil SVM a permis de déterminer les profils des différents stades d'évolution des gliomes (125). La **figure 17** représente les pseudos gels des spectres obtenus pour les différents types tissulaires. Cette représentation permet de donner un aperçu visuel rapide des différentiels protéomiques obtenus pour les différentes classes de tissus. Les spectres sont vus « par le dessus » et chaque bande correspond au sommet du pic pour un m/z donné. L'intensité de chaque pic est représentée par l'intensité de la couleur de la bande, ou à la couleur de représentation, si une échelle d'intensité polychromatique est utilisée.

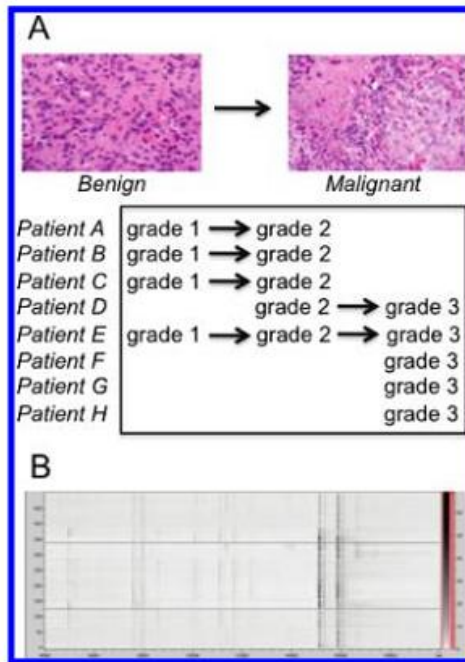


Figure 17: Classification de tissus malins par Support Vector Machines et représentation en pseudo gel des spectres des différents grades de la pathologie.

Il a également été possible de différencier des gliomes de différents stades et d'en identifier les différents marqueurs (126-128). Les premières applications de constructions moléculaires 3D ont pu être faites à partir de tumeurs du cerveau, corrélées avec des images de la tumeur en IRM. Ainsi la localisation de plusieurs marqueurs a pu être mise en relation avec les images classiquement utilisées en médecine (129, 130) comme illustré dans la **figure 18**.

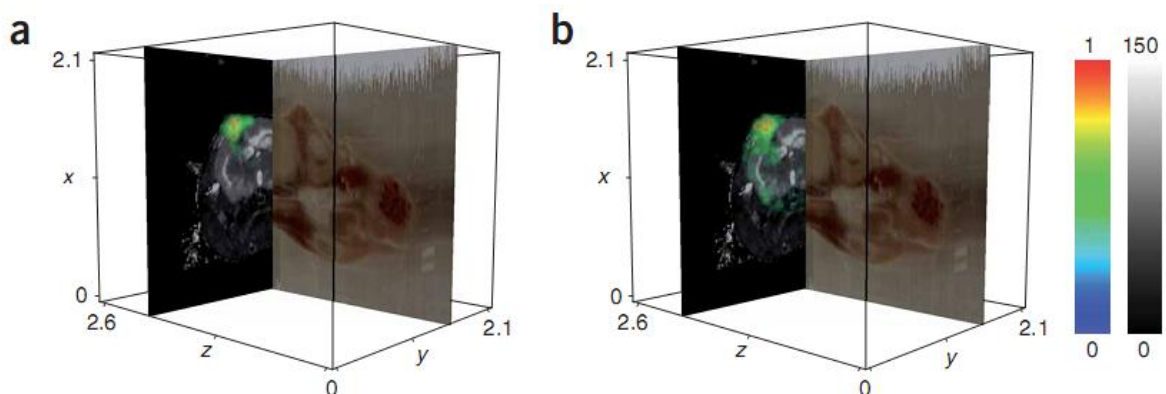


Figure 18: Combinaison de l'imagerie IRM et de l'imagerie MALDI pour la localisation de marqueurs moléculaires

Les analyses MALDI sur tissu sur la recherche sur le cancer du sein. Comme mentionné précédemment, ce cancer a pu être utilisé comme modèle pour la classification de tissus où la présence de marqueurs spécifique avait été vérifiée (119, 120). La classification sous tissulaire de ce type de cancer a également été déterminée, montrant une forte hétérogénéité intra tissulaire (131, 132). Ce modèle a également pu être utilisé à partir d'échantillons FFPE, associé aux méthodes d'antigen retrieval pour la découverte de marqueurs (133) ou la vérification de marqueurs connus (134). La méthode utilisée dans cette dernière investigation est la combinaison de la torche à plasma à l'utilisation d'anticorps couplés à des molécules d'or ou d'argent. Cette méthode a permis la quantification, de manière sensible et reproductible de marqueurs retrouvés par Immuno Histo Chimie.

Pour le cancer du poumon, l'analyse MALDI directe sur tissu a été utilisée pour la prédiction de l'appartenance d'un tissu à un groupe histologique ou à un autre, qui puisse donner une indication sur le pronostic de la pathologie. 15 protéines ont alors pu être déterminées comme étant des marqueurs du cancer du poumon à petites cellules, à faible pronostic (135). Dans une autre étude, l'analyse des tissus FFPE après digestion tryptique a permis, avec l'utilisation de classificateur par SVM, de mettre en évidence 73 pics qui permettaient de déterminer les régions cancéreuses des tissus avec une précision de 97% et le cancer à cellules squameuse avec une précision de 98% (110).

Des tissus de cancer de la prostate ont été analysés par MALDI pour la découverte de marqueurs dans des zones déterminées comme cancéreuses en anatomopathologie. 22 pics ont alors été déterminants dans la prédiction de l'appartenance à des zones cancéreuse avec une sensibilité de 85,21% et une spécificité de 90,74% (118).

Dans une autre étude, MEKK2 (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase kinase 2) a été identifiée pour la première fois comme marqueur du cancer de la prostate par imagerie par spectrométrie de masse sur une cohorte de 54 tissus (136).

Les analyses sur puces de tissu, ont également pu être réalisées sur des modèles de cancer du pancréas où des protéines sont également apparues comme étant discriminantes (137). Une étude a permis de démontrer qu'il était également possible de détecter des protéines marqueurs du cancer dans des tissus initialement déterminés par le pathologiste

comme étant des tissus bénins (138). Encore une fois, il a été démontré dans cette étude l'utilité d'utiliser l'analyse moléculaire sur tissu en complément de l'analyse anatomopathologique pour l'élaboration du diagnostic.

Récemment, l'analyse par PCA d'images de coupes de myxofibrosarcome annotés par des pathologistes ont permis de révéler l'existence de tissus de types intermédiaires aux tissus tumoraux et sains qui n'étaient pas révélés par l'analyse anatomo-pathologique(139). La **figure 19** représente les résultats obtenus des types et sous types histologiques obtenus après analyses PCA et classification hiérarchique. Les branches correspondant aux types intermédiaires n'étaient pas visualisées par le pathologiste.

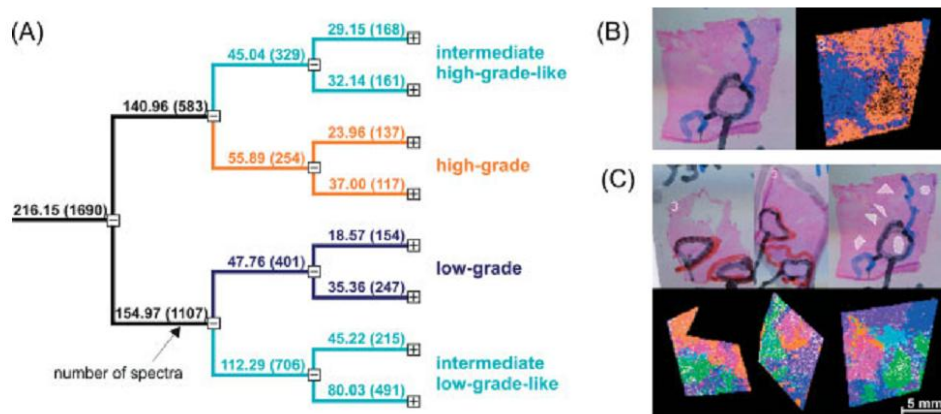


Figure 19: Classification hiérarchique de sous types moléculaires de myxofibrosarcome (139)

De la même manière, Deininger et coll, en 2008, avaient démontré après analyse à partir de biopsies de cancer de l'estomac, que la classification hiérarchique appliquée à l'imagerie MALDI permettait une analyse très fine de la composition moléculaire du tissu et de reconnaître des zones tissulaires qui n'étaient pas visibles par une analyse histopathologique classique (140). La **figure 20** montre les résultats globaux de la classification hiérarchique permettant de différencier les différentes sous classes de tissu.

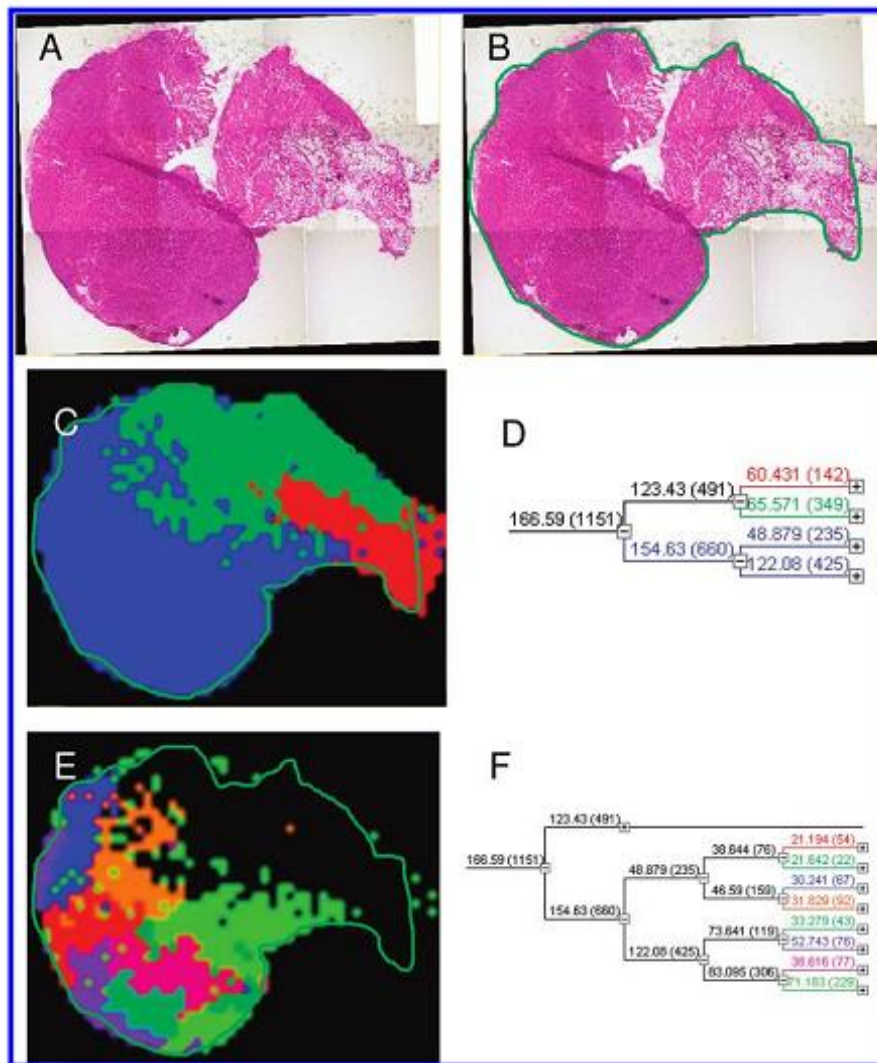


Figure 20: Classifications hiérarchiques de sous types moléculaires de cancer gastrique (140).

Imagerie et recherche de biomarqueurs du cancer de l’ovaire.

Les principales applications de la recherche de biomarqueurs du cancer de l’ovaire ont été faites par notre équipe. En 2007, a été utilisée la méthode d’imagerie MALDI, combinée à d’autres méthodes de protéomique classique pour la recherche et l’identification de marqueurs potentiels pertinents du cancer de l’ovaire (141). 48 tissus (25 adénocarcinomes contre 23 tumeurs bénignes) analysés par profiling ont permis la découverte d’un marqueur de m/z 9744 spécifiquement localisé dans les zones cancéreuses de l’ovaire. Parallèlement aux analyses de profiling MALDI, les protéines ont été extraites du tissu et séparées par HPLC. La digestion des fractions d’intérêt a permis l’identification du peptide de m/z 9744 comme étant le fragment C-terminal de PA28 aussi appelé RegAlpha ou régulateur 11s de

l'immunoprotéasome. La **figure 21** montre les résultats de l'analyse d'identification par approche top-down ou bottom up du peptide de m/z 9744.

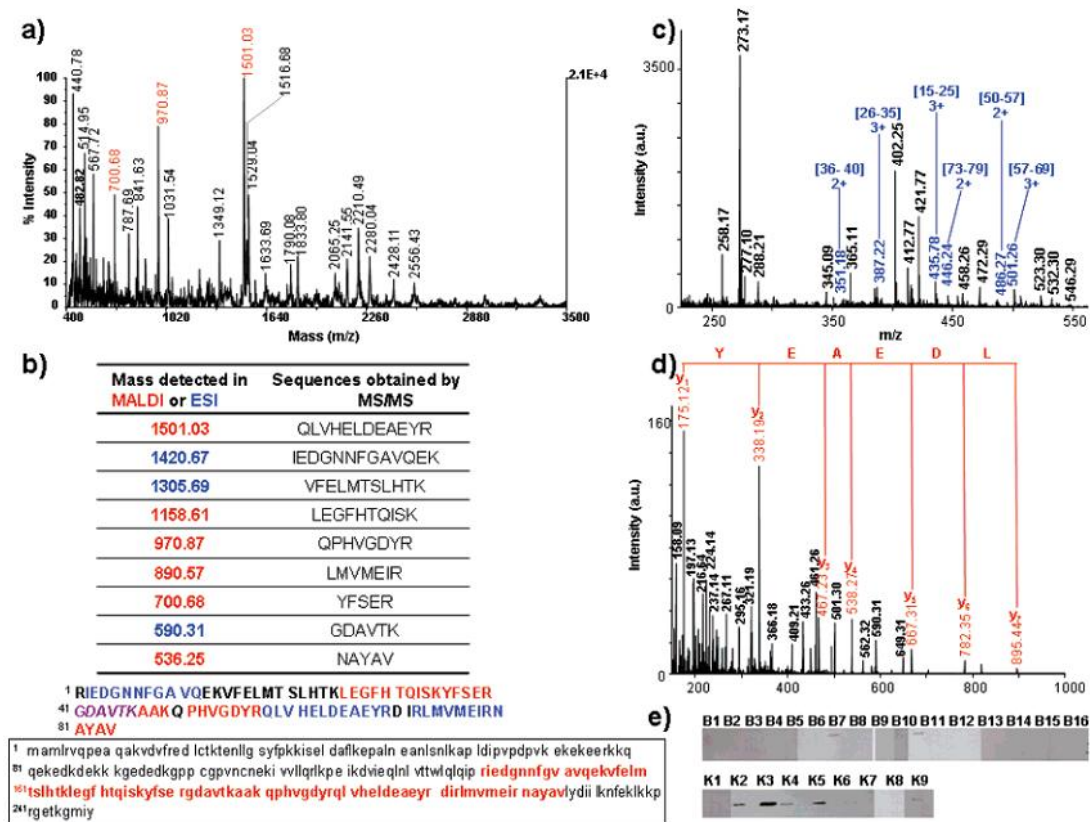


Figure 21: Découverte du fragment Cterminal Reg-Alpha comme marqueur du cancer de l'ovaire (140).

Le complexe régulateur 11S est associé au protéasome 20S, qui est constitué de 3 sous unités : alpha, delta et gamma (142). Cette association permet la dégradation protéolytique lors de la présentation des peptides produits au CMH de classe I. La présence du fragment C-terminal de la sous unité 11S du protéasome indique que celui-ci n'est plus sous une forme active et donc que la machinerie de présentation de l'antigène ne peut ainsi plus être active. Ce mécanisme pourrait être induit par une infection virale. La présence de ce marqueur dans différents tissus pathologiques a pu être validée par Immuno-Histo-Chimie sur une large cohorte de tissus, où il présentait une localisation cytoplasmique dans les tissus cancéreux et nucléaire dans les tissus bénins.

La découverte de ce marqueur est à mettre en relation avec les différents aspects moléculaires d'immunosuppression auparavant décrits dans la littérature. En effet, des études

récentes ont prouvé que l'ascite constituait un environnement propice à l'évolution des cellules tumorales en tant que « fantômes » vis-à-vis du système immunitaire. Cela est entre autre mis en évidence par l'existence de marqueurs associés à la présence de lymphocytes T régulateurs (143).

La présence de ce marqueur a également pu être observée dans les liquides d'ascite et kystique, révélant son utilité comme marqueur de dépistage. Dans cette étude, la présence de Reg-Alpha n'avait cependant pas été recherchée de manière approfondie dans des échantillons de stade précoce de cancérisation. Or, la découverte d'un marqueur pertinent d'une pathologie nécessite qu'on le retrouve à des stades très précoces de la pathologie.

2.3. Les proprotéines convertases

Les différentes phases de l'acquisition du caractère cancéreux d'une cellule et de la progression de celles-ci au de au travers de l'organisme sont régies par des protéines de différents types qui permettent ces gains de fonction particuliers. La fonction de certaines de ces protéines n'est possible que grâce à une maturation moléculaire qui permet leur activation. Les modifications post traductionnelles constituent en effet les dernières étapes du vivant pour l'activation moléculaire. En effet, la sous ou la sur-régulation d'un acteur moléculaire dans une pathologie n'est rien sans que celui-ci ne soit à un état actif. Cet état nécessite parfois l'action d'un effecteur enzymatique qui permet une conversion chimique appropriée.

2.3.1. Nature des proprotéines convertases

Les proprotéines convertases sont des sérines protéases calcium dépendantes qui permettent le clivage de proprotéines après les sites de clivage consensus R-X-K/R-R et les séquences minimales RXXR.

Celles-ci sont encodées par neuf gènes dérivés des homologues kexin chez la levure et subtilisin chez la bactérie. Elles permettent le maintien de l'homéostasie cellulaire via l'activation de nombreuses protéines qui requièrent un clivage protéolytique avant leur action (144). Parmi les 9 proprotéines convertases connues, 8 appartiennent à la famille S8A des protéases à sérine, selon la banque de données des peptidases, MEROPS (145). Elles ont en commun cinq domaines caractéristiques tels que le peptide signal à l'extrémité N-terminale, responsable de l'entrée de l'enzyme dans la voie de sécrétion, un prodomaine qui est une chaperonne intra moléculaire qui permet la conformation correcte de l'enzyme mais permet également une inhibition de celle-ci dans une forme inactive avant qu'elle n'atteigne le compartiment cellulaire qui contiendra une concentration de calcium et un pH adéquats pour son autocatalyse qui permettra son activation. Le domaine catalytique, conservé à hauteur de 50 à 70% entre les différentes PC possède une homologie avec les autres membres des PC et contient la triade catalytique composée des acides aminés Asp, His et Ser, commune à toutes les protéases à sérine qui permettent l'interaction et le clivage de substrats composés d'acides aminés basiques. Le domaine P joue un rôle important dans la stabilité de l'enzyme, la

dépendance au calcium et au pH. Enfin la partie C-terminale varie pour chaque PC et a un rôle dans leurs localisations cellulaires distinctes dans les voies de sécrétion (**figure 22**). Ce à quoi s'ajoutent aussi comme éléments de régulation les disparités d'expression au sein des différents organes. Différentes fonctions sont partagées entre les différents membres de cette famille d'enzymes. Les enzymes furine, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6 sont impliquées dans le clivage de précurseurs dans les voies de sécrétion régulée et constitutives (**figure 23**). Le clivage par les PC résulte en l'activation et l'inactivation de composés clés. L'identification des substrats spécifiques à chaque PC est cependant très difficile en raison de la forte homologie du domaine catalytique. En effet, il apparaît qu'in vitro, beaucoup de substrats peuvent être clivés par plusieurs membres de cette famille d'enzymes. In vivo, la spécificité de ces enzymes pourrait être plus importante si on considère la spécificité de localisation de ces différents membres. L'évaluation de la spécificité de ces enzymes in vivo est donc critique pour en déterminer la réelle fonction, dans un contexte biologique.

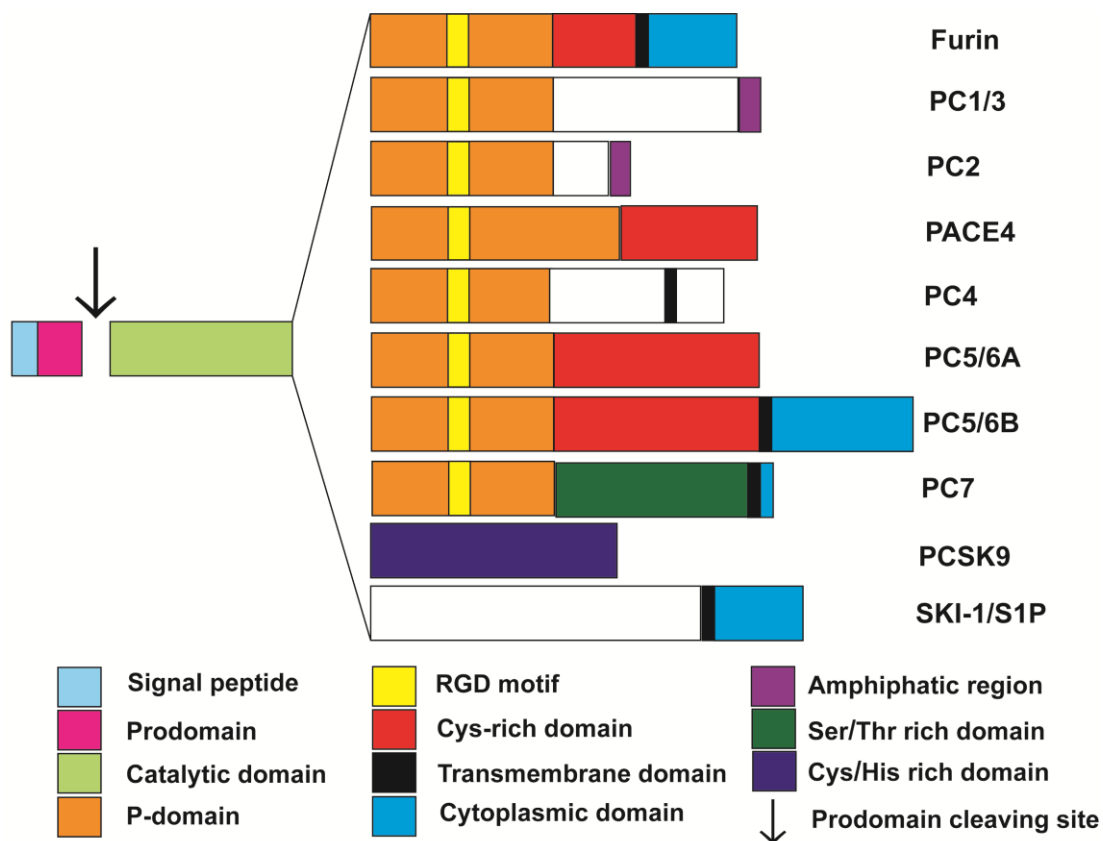


Figure 22: Les différents types de proprotéines convertases et leurs domaines (146)

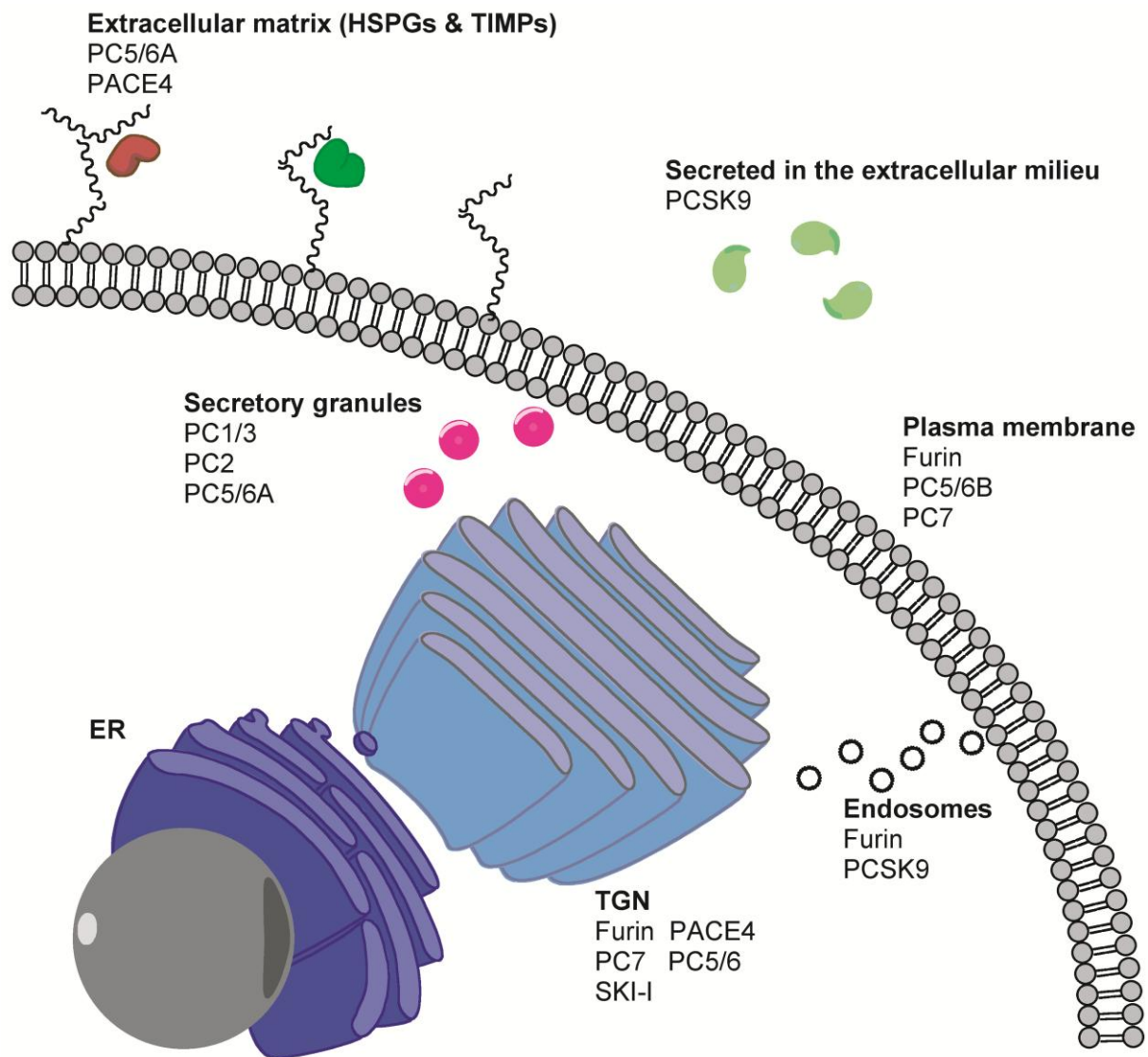


Figure 23:Localisation intracellulaire des proprotéines convertases (146)

2.3.2. Implication des PC dans la progression tumorale et la malignité

Le cancer est un processus séquentiel qui consiste premièrement à l'acquisition du phénotype malin puis à la prolifération des cellules cancéreuses, à l'invasion des cellules dans leur environnement anatomique et dans le réseau de circulation sanguine et lymphatique. L'étape ultime de progression cancéreuse est la dissémination métastatique à distance d'une tumeur provenant d'un site tumoral initial à la totalité des organes de l'individu affecté. Toutes ces étapes sont régulées par des acteurs moléculaires produits par la cellule cancéreuse elle-même ou par la population de cellules qui compose le micro environnement tumoral. Les PC ont été associées au cancer depuis les années 1990. Dans un premiers temps, les PCs

neuroendocriniennes telles que PC1 et PC2 ont été trouvées dans différents types de cancer neuroendocriniens (147-149). Les PCs ubiquitaires sont elles aussi impliquées dans nombreux de cancers non neuroendocriniens. PACE4, par exemple aurait un rôle particulièrement important dans le cancer du sein (150), les cancers de la tête et du cou (151), et comme démontré très récemment, le cancer de la prostate (152). Furine et PC7 semblent également être surrégulées dans de nombreux cancers (150, 153, 154), et seraient associées à la progression tumorale, entre autres fonctions qui seront décrites ci-dessous.

Les proprotéines convertases agissent pour la maturation d'un grand nombre d'acteurs moléculaires de la pathologie, généralement à des étapes avancées de la progression de la maladie. Parmi ceux-ci, nombre de facteurs de croissance traduits sous la forme de proprotéines sont soumis à des maturations par les proprotéines convertases qui permettent leur activation et leur action sur la croissance des cellules cancéreuses. Ceux-ci agissent également pour le recrutement de vaisseaux sanguins requis pour l'apport important de nutriments et d'oxygène aux cellules cancéreuses, qui ont leur activité métabolique largement augmentée (155).

Dans les étapes ultérieures de progression de la maladie, la cellule cancéreuse requiert tantôt la destruction de protéines membranaires, tantôt leur fabrication pour les phases de décrochage de celles-ci de l'environnement tumoral, tantôt leur ancrage à un nouveau site histologique. De plus, des enzymes requis pour la dégradation de la matrice extra cellulaire et la progression de la cellule dans l'environnement tissulaire pour leur implantation sont sécrétées ou dirigées à la membrane cellulaire (156).

La **figure 24** résume l'implication des différents substrats des PC aux différentes étapes d'évolution des cellules cancéreuses. Dans cette figure, chaque flèche horizontale pointe les protéines impliquées substrats des PCs.

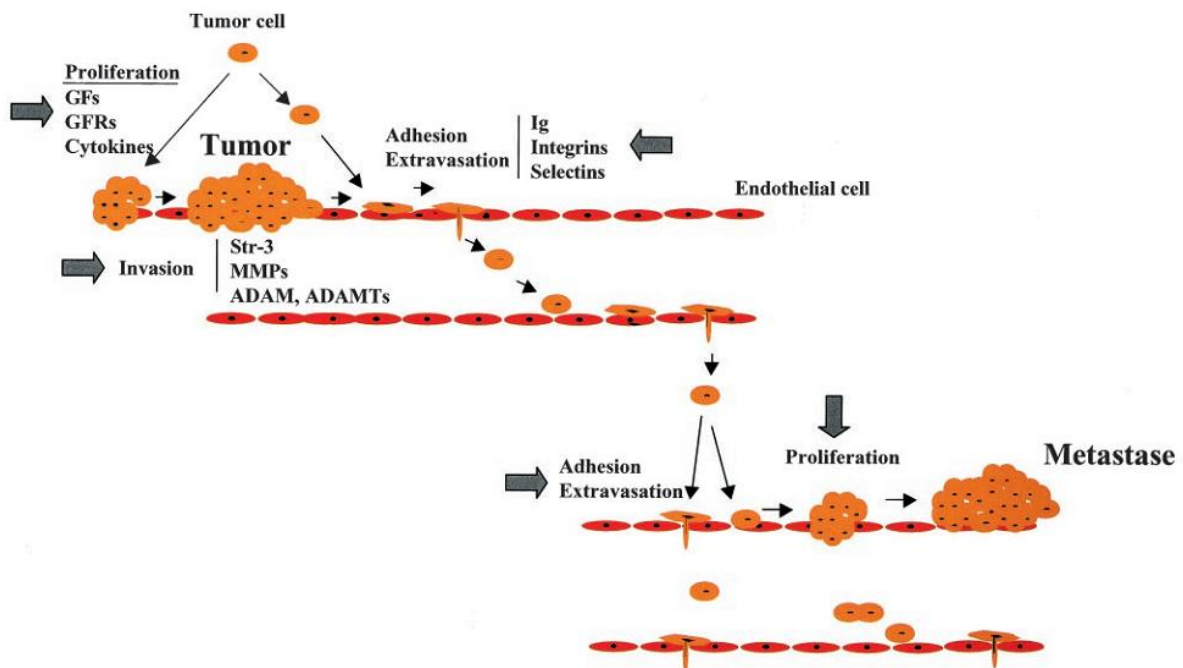


Figure 24: Mécanismes de la métastase et implication des différents substrats des protéines convertases (156)

2.3.2.1. Substrats des PC dans le cancer

Bien que l'implication spécifique de chaque PC dans chaque type de cancer soit encore peu claire, certains de leurs substrats sont associés à des événements caractéristiques des phénotypes cancéreux. Parmi ceux-ci, les métalloprotéases de la matrice (MMP, MetalloProteinases), les facteurs de croissance, et les molécules d'adhésion cellulaire contrôlent respectivement la dégradation de la matrice extracellulaire, la croissance cellulaire, et la migration (156).

Les métalloprotéases (MMP)

La destruction de la membrane basale et de la matrice extra cellulaire est associée à la progression tumorale et à la métastase. La matrice extra cellulaire est une structure protéique complexe composée de collagène, de protéoglycanes, de fibronectine, de vitronectine et de laminines. Les protéinases sécrétées à partir des cellules malignes et stromales dégradent les composants de la matrice afin de faciliter leur progression au sein du tissu hôte. Avant de

pouvoir être active, la première étape menant à ce processus consiste à l'activation des métalloprotéases par les différentes PCs après leur traduction. Parmi ces protéases, on retrouve les MMPs, les MT-MMPs (Membrane Type MMP), les ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase), et ADAM-TS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs). Ces enzymes sont corrélés avec des événements de dissémination métastatique et d'agressivité locale.

La stromélysine-3 est un membre de la famille des MMP. Cet enzyme serait activé par la furine avant sécrétion dans l'environnement extracellulaire (157, 158).

Les MT-MMPs sont surexprimées dans une large variété de cancers, comme le cancer du colon et du cerveau (159-161). Les MMPs permettent l'activation de proMMP2 en MMP-2 et augmentent l'invasion cellulaire *in vitro* et *in vivo* (162, 163). Cette dernière dégrade notamment le collagène des membranes basales.

Les adamalysines sont des métalloprotéases dépendantes au zinc associées à la membrane cellulaire elles aussi activées par les PCs. Elles permettent le clivage de facteurs de croissance tels que le Transforming Growth Factor (TGF) alpha, l'Epithelial Growth Factor (EGF), Katanin-like (KL-1) protein, Macrophage colony-stimulating factor 1 (CSF1), Fas Ligand (Fas-L), et des récepteurs tels que Tumour Necrosis Factor receptor 1 (TNFR1), TNFR2, p75 Nerve Growth Factor Receptor (NGFR), Interleukin 6 Receptor (IL6R), Leukocyte common antigen-related receptor (LAR) (164, 165). Elles ont été associées à de nombreux cancers tels que ceux du sein, de la prostate, du poumon, et du colon (166-168).

Les ADAMTS sont des membres de la famille des ADAMs, contenant des motifs de type thrombospondin. Il a été montré que les ADAMTS 2 et 4 et 11 clivent l'aggrecan à plus de 5 sites, résultant en sa dégradation (166, 169, 170). Brain Enriched HyAluronan Binding protein (BEHAB) est également clivé dans les gliomes, cancers hautement invasifs (171).

Les molécules d'adhésion cellulaire

Les molécules d'adhésion cellulaire sont des protéines de surface cellulaire qui contribuent aux interactions intercellulaires et entre les cellules et la matrice extra cellulaire. Elles contrôlent le trafic cellulaire, les migrations au travers des endothéliums et la localisation de divers acteurs cellulaires lors de l'inflammation ou de la progression tumorale (172). Les Cell Adhesion Molecules (CAMs) sont classées dans trois catégories : les immunoglobulines, les intégrines et les sélectines.

Les immunoglobulines sont composées des Intercellular Cell Adhesion Molecules (ICAMs) 1, 2 et 3 des Vascular Cell Adhesion Molecules (VCAMs) et des Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecules (MadCAMs). Elles sont induites par divers facteurs de croissance et cytokines tels que les interférons gamma, l'interleukine 1, le Tumor Necrosis Factor (TNF) alpha, IGF1 et les endothélines qui sont tous des substrats des PCs (173-179).

Les intégrines sont impliquées dans progression tumorale et métastatique (180, 181). Ce sont des récepteurs hétérodimériques alpha-béta qui lient des ligands tels que les ICAM et VCAM et divers éléments de la matrice extracellulaire. Les domaines extracellulaires des sous unités sont requis pour la fixation des ligands. Alors que la partie cytoplasmique interagit avec le cytosquelette et induit des changements dans la forme de la cellule, sa mobilité et permet la transduction des signaux de croissance et de survie cellulaires (182, 183). De plus, il a été démontré que l'activation des intégrines pourraient médier l'activité des MMPs et de l'urokinase de nombreuses cellules tumorales, telles que dans les mélanomes et le cancer du colon (184-186).

Les selectines comprennent les L- et P- et E selectines et sont impliquées dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Celle-ci est initiée par de faibles interactions qui induisent un mouvement de roulement (« rolling ») sur la surface endothéliale. Ce mécanisme est utilisé par les cellules cancéreuses pour leur dissémination par l'intermédiaire du réseau circulatoire (172, 187-189). Les selectines lient alors différents types de glycanes, de glycoprotéines, de glycolipides, de protéoglycans ou de tetrasaccharides sialyl-Lewis (190).

Les facteurs de croissance et leurs récepteurs

La croissance des cellules cancéreuses et de leurs métastases nécessite des signaux spécifiques générés par la présence de facteurs de croissance dans l'environnement tumoral. Ces facteurs permettent l'entrée et la progression dans le cycle cellulaire des cellules. Il en existe de deux catégories : les facteurs de compétence qui permettent l'entrée dans la phase G1 du cycle cellulaire et les facteurs de progression qui promeuvent la division cellulaire (191-194). Beaucoup de ces facteurs sont traduits sous forme de proprotéines et sont clivés par des enzymes de la famille des PCs pour leur activation. Cette activation est liée à une augmentation de la croissance tumorale. Les facteurs clivés par les PCs incluent l'IGF-1, les endothélines, le Nerve Growth Factor (NGF), la Parathyroid hormone (PTH) et le TGF-béata (195) (193, 196-199). Les facteurs de croissance fonctionnent en général par l'activation du récepteur à tyrosine kinases qui transmettent le signal vers l'intracellulaire (193). L'activation du récepteur à travers la liaison des ligands induit généralement la dimérisation du dit récepteur et l'autophosphorylation des monomères impliqués, ce qui va permettre l'association de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (193, 200).

2.3.2.2. Implication des PC dans le cancer de l'ovaire

Dans le modèle de cancer abordé lors de mon doctorat, l'implication des différentes proprotéines convertases n'est pas clairement élucidée. L'équipe de Bassi a proposé en 2007 que l'expression de furine était largement augmentée dans les tissus de cancer de l'ovaire épithéliaux, contrairement à PACE4 dont la quantité était diminuée. Cependant, cette étude ne tenait pas compte de certains paramètres importants tels que la survie après 5 ans de la patiente dont le tissu été analysé (154). En effet, il a même été montré dans cette même étude que le taux de PACE4 et PC7 était bien plus important dans les tissus des patientes qui avaient un taux de survie au-delà de cinq ans important (**figure 25**).

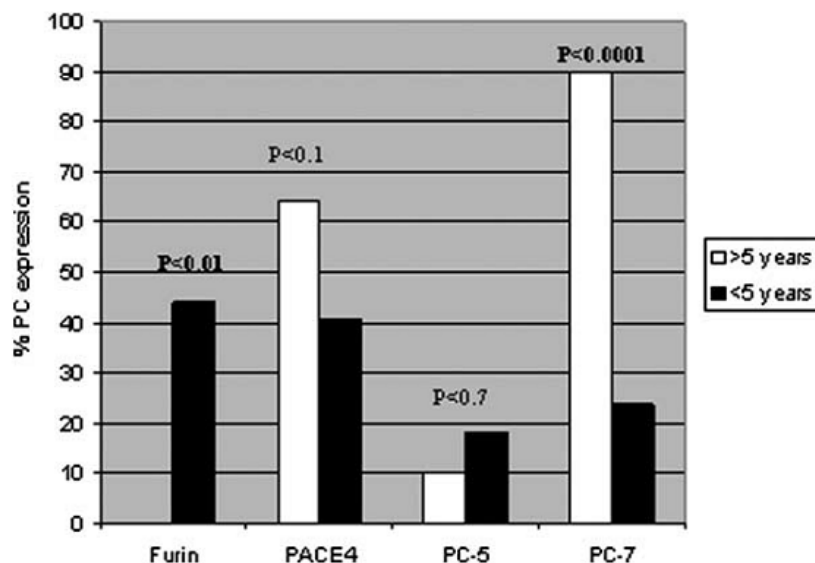


Figure 25: Expression de différentes PC dans le cancer de l’ovaire, pour des survies des patientes supérieures ou inférieures à 5 ans (154).

Le niveau d’agressivité de la cellule cancéreuse pourrait alors être lié à l’implication d’une balance de différentes PC. Certaines convertases pourraient alors prendre le relai sur d’autres à différentes étapes de la progression de la maladie. Les convertases d’importance majeure pour la création d’inhibiteurs thérapeutiques seraient alors celles dont l’expression est augmentée lors des phases précoces de la maladie, alors qu’un traitement est encore possible. La même observation étaient à déplorer dans l’étude de l’équipe de Nachtigal et coll. en 2002 qui démontrait l’existence d’un mécanisme de régulation épigénétique de la PC PACE4, conduisant à sa sous régulation, dans des cultures primaires de cellules cancéreuse provenant de l’ascite de patientes, et de certaines lignées cellulaires stables (201). Un effort important de la part de la communauté scientifique serait alors nécessaire pour la détermination du rôle pondéré de chaque PC dans différentes lignées de cancer de l’ovaire, à corrélérer avec des données *in vivo*. Pour des analyses sur tissus provenant de patientes, il est également très important d’obtenir les renseignements nécessaires concernant la progression de sa maladie. Des cibles des enzymes précoces de la maladie seraient alors hautement pertinentes pour l’élaboration de traitements médicamenteux.

Les objectifs de mon doctorat ont été établis autour de deux axes de recherche.

- Le premier a été de montrer en quoi l'imagerie et plus particulièrement le profiling MALDI peuvent être utiles à la recherche de marqueurs d'intérêts et à la définition de signatures moléculaires des différents stades de la pathologie. Nous verrons également comment l'analyse moléculaire peut être au service de problématiques purement cliniques. La méthode d'analyse MALDI directe sur tissu est encore une technique jeune qui nécessite une adaptation à la problématique recherchée. Une très grande partie du manuscrit présenté ici consiste à la description détaillée de l'élaboration de développements pour l'amélioration de la technique et leur utilisation dans des buts spécifiques liés à la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire.
- La deuxième partie du manuscrit consiste à la détermination de l'implication des proprotéines convertases dans le cancer de l'ovaire. Ces enzymes sont des marqueurs fonctionnels maintenant bien connus de différents types de néoplasies. Cependant, la balance d'action des différentes convertases est à ce jour largement méconnue dans le contexte complexe de la progression du cancer de l'ovaire. Le but de cette deuxième partie aura été d'utiliser une stratégie novatrice de génération de lignées cellulaires knock-down pour chacune des PCs endogènes séparément pour la détermination de leurs fonctions spécifiques dans le cancer de l'ovaire.

Chapitre 3 : Résultats

**Partie 1 : Développement de méthodes pour l'extraction de
protéines de hautes masses moléculaires sur tissu**

Objectif 1 :

La première question à laquelle nous voulions répondre était celle de la pertinence de la technologie d'analyse sur tissu pour l'étude des protéines ayant une masse supérieure à 30kDa. En effet, il fallait repousser les limites de la technique qui butait au niveau de la détection de protéines supérieures à 30 kDa lors des analyses classiques. Un parallèle avec les analyses protéomiques en gel 2D était important pour la comparaison entre ces deux technologies en vue d'avoir une vision plus globale du protéome. Dans ce contexte, nous avons développé dans un premier temps des stratégies permettant l'accès à ces protéines de hautes masses.

Publications 1 & 2 :

Frank J., Longuespée R., Wisztorski M., Van Remoortere A., Van Zeijl R., McDonnell L., Salzet M., Fournier I. MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30 000 Da. *Med Sci Monit.* (2010) 16(9):BR293-9.

Van Remoortere A, van Zeijl RJ, van den Oever N, Franck J, Longuespée R, Wisztorski M, Salzet M, Deelder AM, Fournier I, McDonnell LA. MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue. *J Am Soc Mass Spectrom.* (2010) 21(11):1922-9

La détection de certaines classes de molécules dépend de manière importante du solvant utilisé par la solubilisation de la matrice qui est déposée sur la coupe de tissu analysée. Afin d'atteindre le but de l'analyse, un choix pertinent de la solution de matrice ainsi que des adaptations particulières doivent être réalisées afin d'accéder à la gamme de masse d'intérêt. Dans la gamme de masse des protéines, le dépôt classique de matrice ne permet pas de détecter sur une coupe des protéines ayant une masse supérieure à 30kDa. Or, de nombreuses protéines d'intérêts comme les protéines membranaires ou les récepteurs ont des masses bien supérieures. En protéomique classique, il est possible de détecter des protéines hydrophobes ou membranaires via le développement de certaines procédures utilisant soit des solvants hydrophobes pour l'analyse directe sur coupe (202) soit du Triton X-100 comme détergent (203) ont été réalisées. De plus, il a clairement été démontré que l'analyse directe sur coupe permet la détection de différentes classes de protéines suivant les propriétés de la solution contenant la matrice qui est déposée sur la coupe. Dans ce contexte, de nouvelles procédures ont donc été développées afin de faciliter l'extraction de protéines hydrophobes directement sur coupe de tissu.

L'objectif des développements présentés dans ce chapitre était d'élaborer différents protocoles de traitement des tissus afin de permettre l'analyse des protéines de hautes masses moléculaires en imagerie MALDI. Le travail réalisé a consisté à permettre une extraction sélective des protéines les plus hydrophobes ainsi que leur meilleure intégration dans le cristal d'acide sinapinique. Plusieurs protocoles ont été mis au point pour permettre l'analyse directe de protéines de masses moléculaires supérieures à 50 kDa. Différentes étapes pour la préparation de l'échantillon ont été appliquées aux tissus. L'application de dépôts successifs de matrice à différents volumes et différentes concentrations sont testés afin d'obtenir un rapport signal/bruit optimal pour les protéines habituellement détectées en analyse directe avec un dépôt à la pipette. Enfin, des traitements spécifiques avec des solutions d'acides ou de composés aux propriétés chaotropes ont aussi été testés et répétés pour permettre la dénaturation des protéines visant à permettre leur meilleure incorporation dans les cristaux d'acide sinapinique. Des solvants apolaires ont également été utilisés pour l'extraction des protéines les plus hydrophobes (94). La première image du « protéome de haute masse moléculaire » a été réalisée grâce à l'utilisation du détecteur CovalX (204). Cet appareil est conçu pour la détection de complexes non covalents de hautes masses moléculaires,

difficilement analysables avec les détecteurs de types Micro Channel Plate (MCP), équipant classiquement les spectromètres MALDI/TOF ou TOF/TOF.

3.1. 1. Extraction des protéines des hautes masses moléculaires sur coupe

3.1.1.1. Optimisation du dépôt de la matrice

L'acide sinapinique (SA) est historiquement la matrice la mieux adaptée pour la désorption/ionisation des composés de haut poids moléculaires (205). Contrairement à l'analyse classique de mélange de composés sur plaque, l'analyse directe de tissu demande en premier lieu une bonne extraction des molécules en plus d'une bonne incorporation de celles ci dans les cristaux de matrice. Afin d'améliorer ces paramètres, et d'étudier l'effet de la quantité de matrice (206) et du volume de solvant déposés, différentes concentrations de matrice dans différents mélanges ont été testées pour l'analyse directe de coupes de cerveaux de rat. Les résultats montrent (**figure 26**) qu'une solution classique de SA déposée sur une coupe (**figure 26a**), permet d'obtenir un signal, mais avec des pics de faible intensité et peu de signaux pour une gamme de masse supérieure à m/z 20 000. Lorsqu'une deuxième couche de cette même solution est déposée après séchage complet de la première, le spectre obtenu (**figure 26b**) présente des pics de plus forte intensité et en plus grand nombre. De nombreux pics sont également détectables au dessus de m/z 20 000. Néanmoins ce type de dépôt reste difficilement compatible pour l'imagerie MALDI. Pour étudier si la concentration de SA avait un impact sur le signal obtenu, des tests ont été réalisés en déposant une solution deux fois plus concentrée que la normale (**figure 26c**). Les spectres obtenus montrent un profil similaire à celui obtenu avec les deux couches de matrices (**figure 26b**) avec de nombreux pics obtenus au dessus de m/z 20 000. Enfin pour vérifier si le signal obtenu est dépendant de la quantité finale de matrice déposée ou du volume de solution déposée, une solution concentrée à 20mg/ml de SA à également été utilisée mais en déposant un volume deux fois plus important pour recouvrir la coupe (**figure 26d**). Dans ce cas, les pics obtenus présentent le même rapport signal/bruit, le même nombre de pics et la même intensité que ceux obtenus avec un volume moins important mais une concentration de SA plus importante.

Ces expériences permettent de montrer que la qualité des spectres obtenus dépend de la quantité finale de matrice déposée plus que du volume de solution utilisée pour recouvrir la coupe, du moins lorsque celui-ci excède 10 μ L. Pour la suite des expériences d'analyse

directe, la concentration de la matrice est donc fixée à 40 mg/mL pour des dépôts de 10 μ L de matrice.

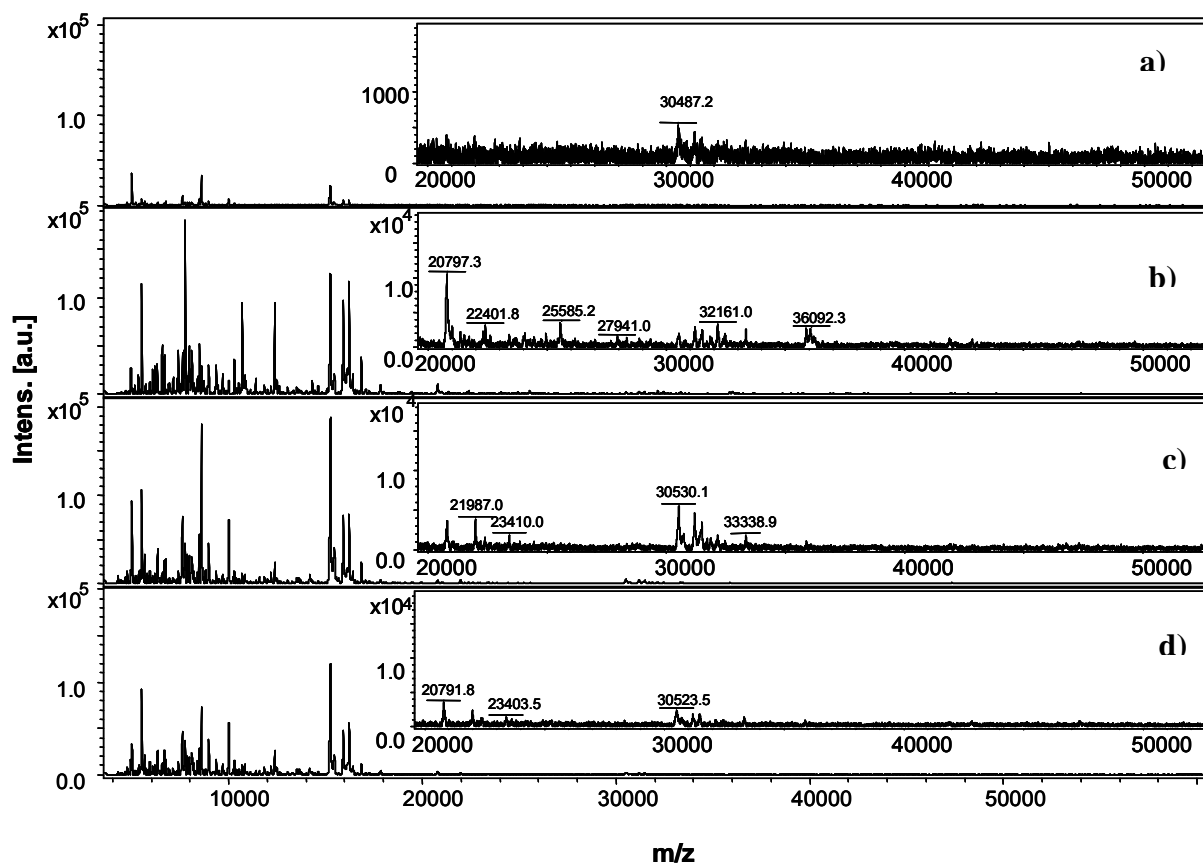


Figure 26 : Spectres de masse obtenus à partir d'analyses directes de coupes de cerveaux de rat sur lesquelles ont été déposé, a) 10 μ L de SA à 20mg/mL ; b) 2 x 10 μ L de SA à 20mg/mL ; c) 10 μ L de SA à 40mg/mL ; d) 20 μ L de SA à 20 mg/mL

3.1.1.2 Utilisation de Chaotropes

La suite des expériences eut pour but de trouver un protocole permettant d'améliorer la détection des ions de m/z supérieurs à 20 000. Dans cette perspective, les premières manipulations ont été inspirées par les protocoles couramment utilisées en analyses protéomiques classiques, comme l'utilisation de chaotropes. En effet la solubilisation des protéines se trouve améliorée en rompant les interactions inter et intramoléculaires. Ces interactions sont majoritairement de types non covalentes comme les liaisons ioniques, hydrogènes ou les interactions hydrophobes. Pour rompre ces liaisons, l'urée peut être utilisée (207, 208). Des tests avec des dépôts d'urée ont donc été entrepris pour étudier l'effet sur l'extraction des protéines sur coupes. Le traitement de la coupe à l'urée ne peut se faire qu'à

une concentration de 1M, car les cristaux obtenus quand l'urée est déposée à une concentration de 8M sont trop épais et provoquent une suppression d'ions et un bruit de fond importants au niveau du signal. Pour analyser une coupe après le dépôt d'une solution d'urée 1 molaire (1M), un dépôt de deux couches de solution d'acide sinapinique est nécessaire, l'urée gênant la formation de cristaux de matrice lors d'un unique dépôt de matrice. La **figure 27** présente les résultats d'une comparaison entre une coupe sans (**figure 27a**) ou après dépôt d'urée (**figure 27b**). Le spectre obtenu après traitement montre des signaux de plus grande intensité et en plus grand nombre pour des masses supérieures à m/z 20 000. Des pics sont détectables jusqu'à m/z 50 000 alors qu'en absence de traitement, peu de signaux sont détectables au dessus de m/z 35 000.

Néanmoins, ce traitement n'est pas applicable à l'analyse d'une coupe par imagerie MALDI car le signal obtenu n'est pas homogène sur toute la surface de la coupe et que le traitement est difficilement répétable. De plus aucune méthode de dépôt automatique utilisée pour la préparation de la coupe en imagerie MALDI ne permet de supporter une telle concentration d'urée.

Cependant, les résultats obtenus avec ce protocole permettent d'en déduire que l'extraction des protéines est améliorée lorsque que celles-ci sont dénaturées, sans doute grâce à une meilleure incorporation dans les cristaux de matrice. Un moyen doit donc être trouvé pour permettre la dénaturation des protéines, cette fois-ci avec un composé compatible avec l'analyse en spectrométrie de masse et en particulier l'imagerie MALDI.

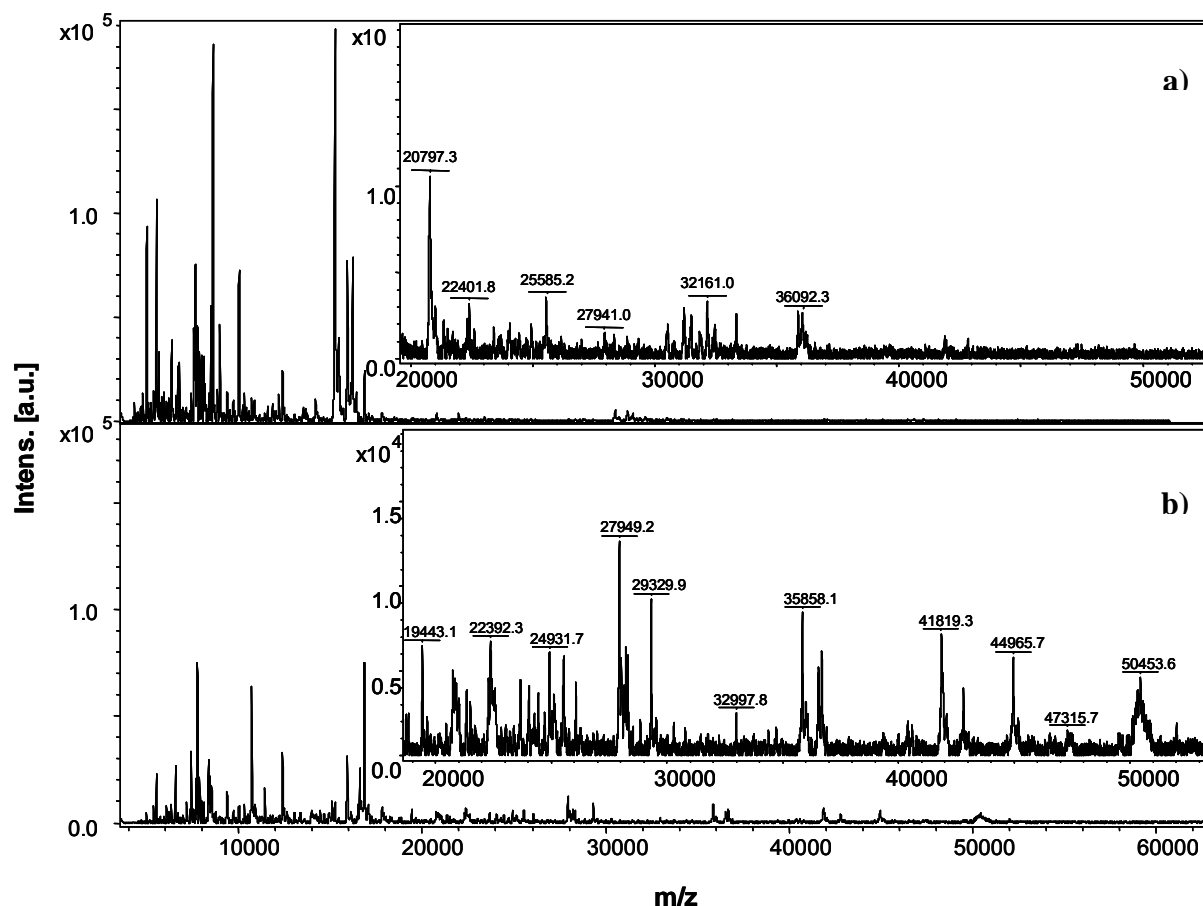


Figure 27 : Analyses directes MALDI de coupes de cerveau de rat non traitées (a), ou traitées par un dépôt de 10 μ L d'urée 1M dans l'eau (b)

3.1.1.3. Utilisation de solutions acides

Une autre stratégie pour la dénaturation des protéines est la création de protonations sur les groupements basiques des protéines contenues dans la coupe, induisant des répulsions de charges au sein de celles ci pour permettre la rupture des liaisons interprotéiques et une meilleure intégration dans le cristal de matrice. Dans cette optique, différents protocoles utilisant l'acide trifluoroacétique (TFA) sont utilisés pour le traitement des coupes de tissu.

Dépôt de TFA 10%

Dans un premier temps, une solution de TFA 10% est déposée sur la coupe pour permettre la dénaturation des protéines. Des expériences avec des concentrations supérieures de TFA montrent que l'utilisation de solutions plus acides détruit la coupe et rend l'analyse impossible. La **figure 28** montre les résultats obtenus pour l'analyse directe d'une coupe non

traitée avec ce dépôt (**figure 28a**) par rapport à une coupe traitée (**figure 28b**). De nombreux pics pour des m/z supérieurs à 20 000 apparaissent pour les coupes après traitement. Une observation est cependant faite : l'intensité des pics dans les faibles m/z reste élevée, une suppression des ions pour les protéines de hauts poids moléculaires peut être induite par l'abondance des ions relatifs aux peptides.

Bains des coupes de tissu dans le TFA 10%

Les peptides sont des composés relativement polaires, miscibles dans des solutions aqueuses. Le but de faire des lavages par bains des coupes de tissus est de s'affranchir du phénomène de suppression d'ions (209) provoquée par l'abondance des peptides présents sur la coupe en les solubilisant dans la solution de TFA 10%. La **figure 28c** nous montre les résultats obtenus après avoir plongé la coupe dans un bain de TFA 10%. De nouveaux pics apparaissent au dessus de m/z 20 000 avec notamment des pics à m/z 50 000. Les pics précédemment observés après un dépôt pipette de TFA 10% sont également présents et apparaissent avec une intensité plus élevée.

Ces tests sont réalisés plusieurs fois mais cette méthode apparaît peu reproductible pour l'extraction de protéines de hauts poids moléculaires. De plus, elle présente un risque potentiel de délocalisation des protéines extraites au sein du tissu, ce qui empêche son utilisation pour l'imagerie MALDI.

Enfin, les groupements apolaires des protéines sont difficilement exposés dans l'eau qui va limiter leur dénaturation. Un procédé de traitement des coupes au TFA doit être utilisé, qui ne nécessiterait pas le contact du tissu avec ce solvant et puissent permettre une extraction des protéines de hautes masses moléculaires malgré la suppression d'ion provoqué par l'abondance des peptides.

Exposition des coupes de tissu aux vapeurs de TFA 10%

Les fluors présents sur les molécules de TFA font que ce composé est très volatile. L'exposition des coupes à des vapeurs de TFA permettent de traiter ce tissu avec ce composé sans le mettre en contact avec l'eau de la solution. Ce procédé permet de s'affranchir du risque de délocalisation des protéines provoqué par un traitement du tissu par un bain de TFA

10%. Des coupes de tissu sont exposées à des vapeurs de TFA 10% pendant 15 à 20 minutes. Là encore, des essais sont réalisés avec des solutions plus acides. Celles-ci détruisent la coupe rapidement et rendent impossible la préparation du tissu pour l'imagerie. L'eau, permettant de réaliser la solution, freine la volatilité du TFA et la destruction du tissu qui en résulte. Un dépôt de SA à 40mg/mL est réalisé sur la coupe juste après traitement de la coupe aux vapeurs de TFA 10%. Une observation est alors faite : la goutte de SA 40 mg/mL est difficile à étaler sur la surface de la coupe. L'environnement du tissu, après traitement de la coupe aux vapeurs de TFA est donc plus hydrophobe que le mélange ACN/TFA 0.1% 7:3 v:v. Cette observation confirme l'action attendue du TFA sur le tissu, *i.e.* l'exposition des groupements apolaires des protéines, donc leur dénaturation.

Les spectres obtenus après analyse directe sont présentés sur la **figure 28d**. Les pics jusqu'à environ m/z 50 000 sont présents sur ce spectre en plus grande intensité qu'avec les traitements impliquant le contact de l'eau avec le tissu. La manipulation est répétée plusieurs fois mais le procédé apparaît peu reproductible. La solution aqueuse utilisée pour la solubilisation de la matrice, peu propice au maintien de l'exposition des groupements apolaires des protéines est probablement responsable du passage de la protéine d'un état dénaturé à une conformation repliée.

L'utilisation d'un solvant permettant le maintien des protéines dans leur état dénaturé serait essentiel après le traitement du tissu par le TFA 10%.

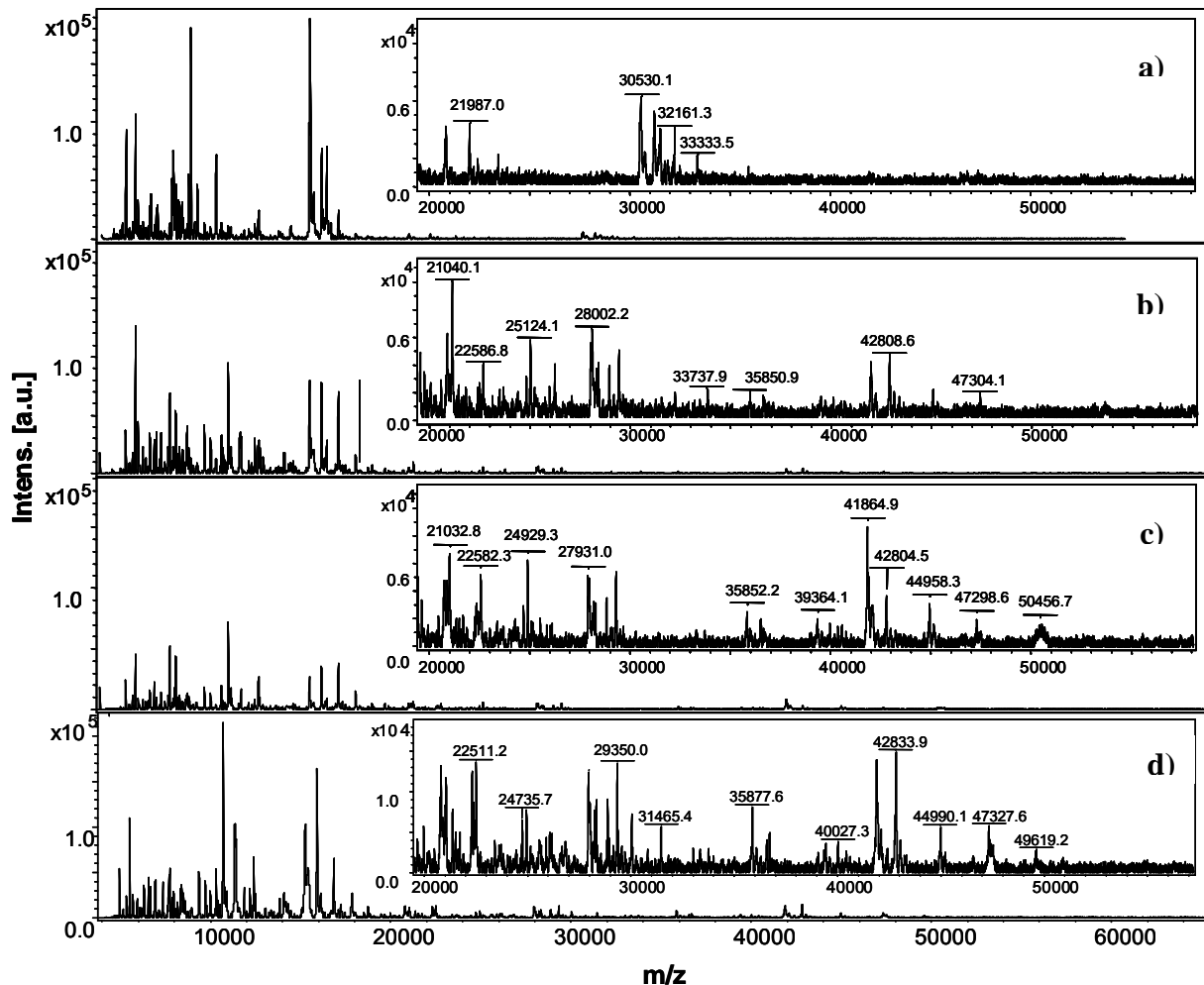


Figure 28: Spectres de masse obtenus à partir d'analyses directes de coupes non traitées (a), traitées par un dépôt de 10 μ L de TFA 10% (b) par un bain de TFA 10% (c), et par l'exposition à des vapeurs de TFA 10% pendant 15 minutes(d).

Afin de vérifier que la méthode n'entraîne pas une délocalisation des protéines au sein de la coupe, des spots de SA sont déposés grâce à un système de microdépôt (microspotting) automatique (CHIP-1000) sur une surface chevauchant le tissu et la lame. Les spectres obtenus pour l'analyse des spots déposés sur le tissu et sur la lame sont présentés **figure 29**. Un signal n'est obtenu que pour les spots déposés sur la coupe et non pour ceux déposés sur la lame, à la limite du tissu. Cette information indique qu'il n'y a pas de délocalisation et que ce procédé peut être utilisé pour la préparation des coupes à l'imagerie des protéines de hautes masses moléculaires sans risque de délocalisation de celles-ci.

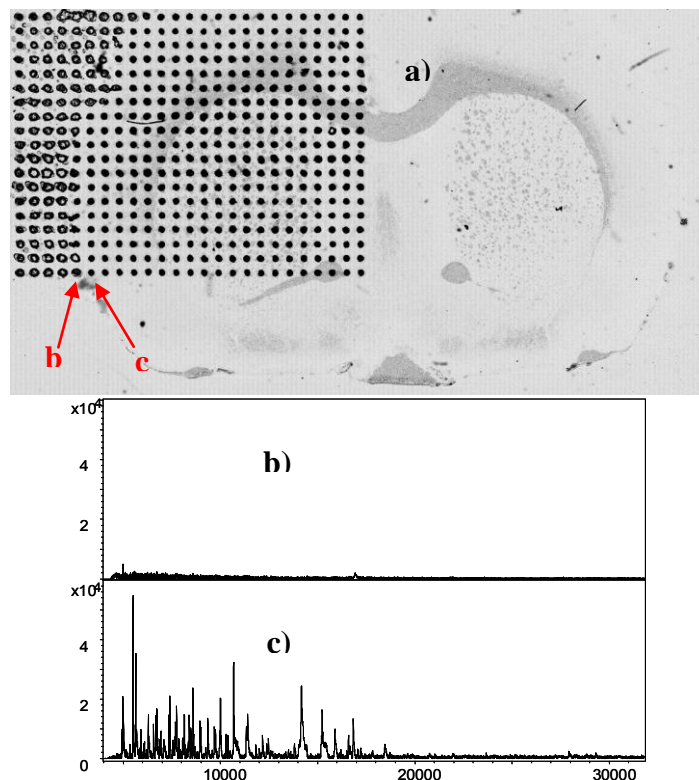


Figure 29: Coupe de cerveau de rat traitée aux vapeurs de TFA 10% et spotté de SA 10mg/mL. Les spots analysés sont marqués de flèches rouges et les lettres(a). Spectres de masse obtenus pour l'analyse des spots b(b) et c(c)

3.1.1.4. Utilisation de solvants apolaires pour l'extraction de protéines de hautes masses moléculaires

Utilisation du TriFluoroEthanol TFE

Pour la préparation des échantillons en protéomique, une alternative à l'utilisation de chaotropes et de surfactants pour la solubilisation des protéines peut être l'utilisation de solvants apolaires. Ces solvants créent un environnement favorable à la dénaturation des protéines et à leur séparation les unes des autres (210-214).

Le TFE fait partie de ces solvants. Il est utilisé pour la solubilisation de protéines hydrophobes dans divers protocoles d'extraction de protéines. Des études montrent que les molécules de TFE se regroupent pour interagir avec les régions hydrophobes locales des protéines en rompant les structures d'eau environnant ces groupes, pour constituer un solvant

idéal pour l'association de chaînes latérales hydrophobes proches les unes des autres. Cette association des chaînes latérales hydrophobes entre elles permet de maintenir les conformations secondaires au sein des protéines mais de rompre les conformations tertiaires de celles-ci en entraînant une dénaturation globale des protéines (215-217).

10 μ L de TFE sont déposés sur la coupe de tissu après que celle-ci ai été traitée par des vapeurs de TFA10%. La solution de matrice est ensuite déposée sur la coupe. La **figure 30** montre le spectre obtenu avec ce protocole (**figure 30b**), comparé à celui sans utilisation de TFE (**figure 30a**). Les profils de pics sont similaires pour les deux protocoles, l'extraction des protéines de hautes masses moléculaires est donc comparable dans les deux cas.

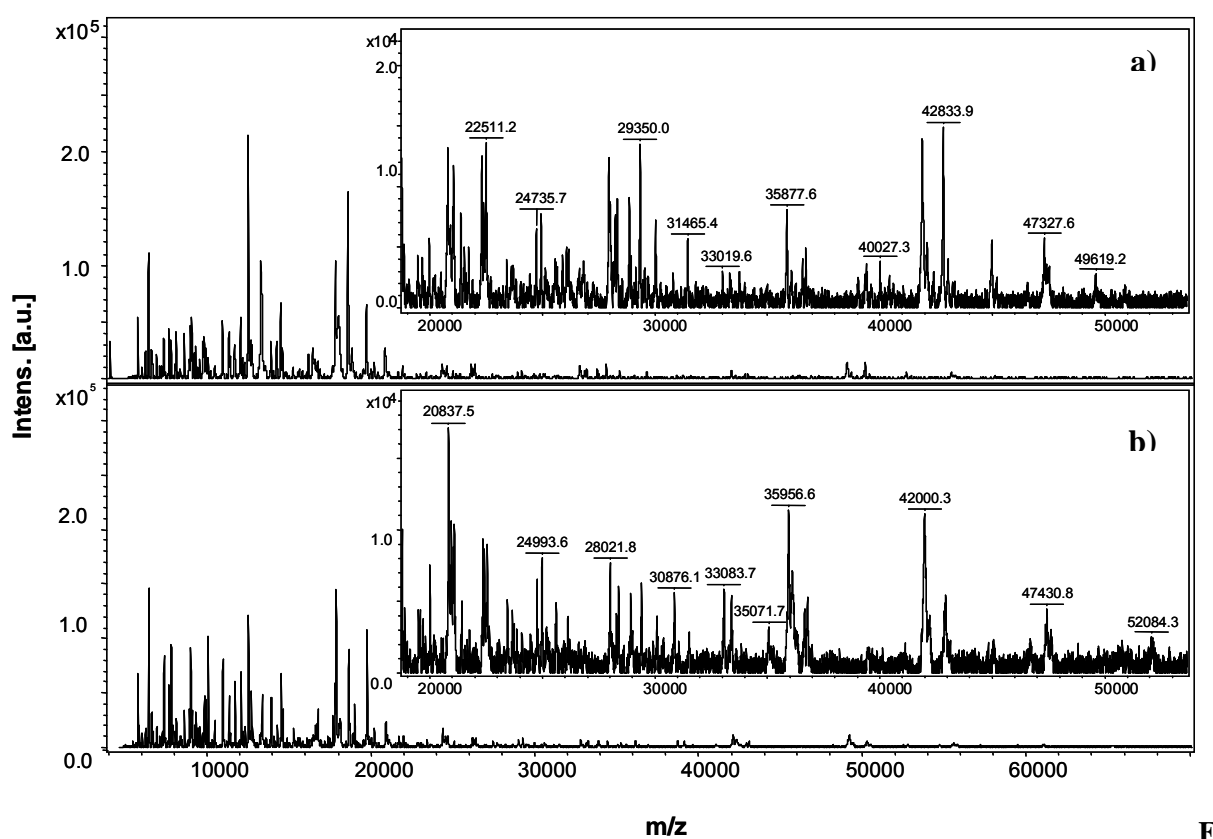


Figure 30: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes traitées par exposition aux vapeurs de TFA 10%(a); traitées par exposition aux vapeurs de TFA 10%, dépôt de TFE, dépôt de SA 40mg/mL dans ACN/TFA0.1% 7:3(b)

Néanmoins l'extraction des protéines de hautes masses moléculaires apparaît très aléatoire avec l'utilisation de ce protocole. Il a été démontré que l'action du TFE sur la conformation des protéines était hautement dépendante de la température (215) . Ce facteur, difficilement contrôlable dans notre cas pourrait limiter l'action du TFE et favoriser un retour

à la conformation normale des protéines lors de l'application de la matrice solubilisée dans une solution aqueuse. Un moyen d'éviter ce phénomène serait de réaliser simultanément l'exposition des groupements apolaires de la protéine au solvant et la co-cristallisation des composés avec la matrice. La matrice SA n'étant pas miscible dans le TFE, un autre solvant doit être utilisé pour permettre l'incorporation dans le cristal de matrice des protéines dénaturés dans le TFE. L'éthanol, plus apolaire que l'eau et miscible dans le TFE, est utilisé pour la solubilisation de SA pour permettre l'incorporation des protéines dépliées et solvatées par le TFE. Une première couche de SA EtOH à 20mg/mL est donc déposée puis une deuxième couche de SA ACN/TFA à 40 mg/mL pour obtenir une cristallisation optimale de la matrice. La **figure 31** montre le spectre obtenu pour l'analyse directe des coupes après traitement avec ce protocole, celui-ci permet l'obtention en analyse directe de pics de m/z supérieures à 20 000, jusqu'à environ 50 000. L'intensité des pics observés entre m/z 20 000 et 30 000 est supérieure avec le dépôt de la couche de SA dans EtOH. L'éthanol étant un solvant apolaire permettant tant le piégeage de protéines solvatées par le TFE, ces protéines préférentiellement extraites doivent être de nature très hydrophobe.

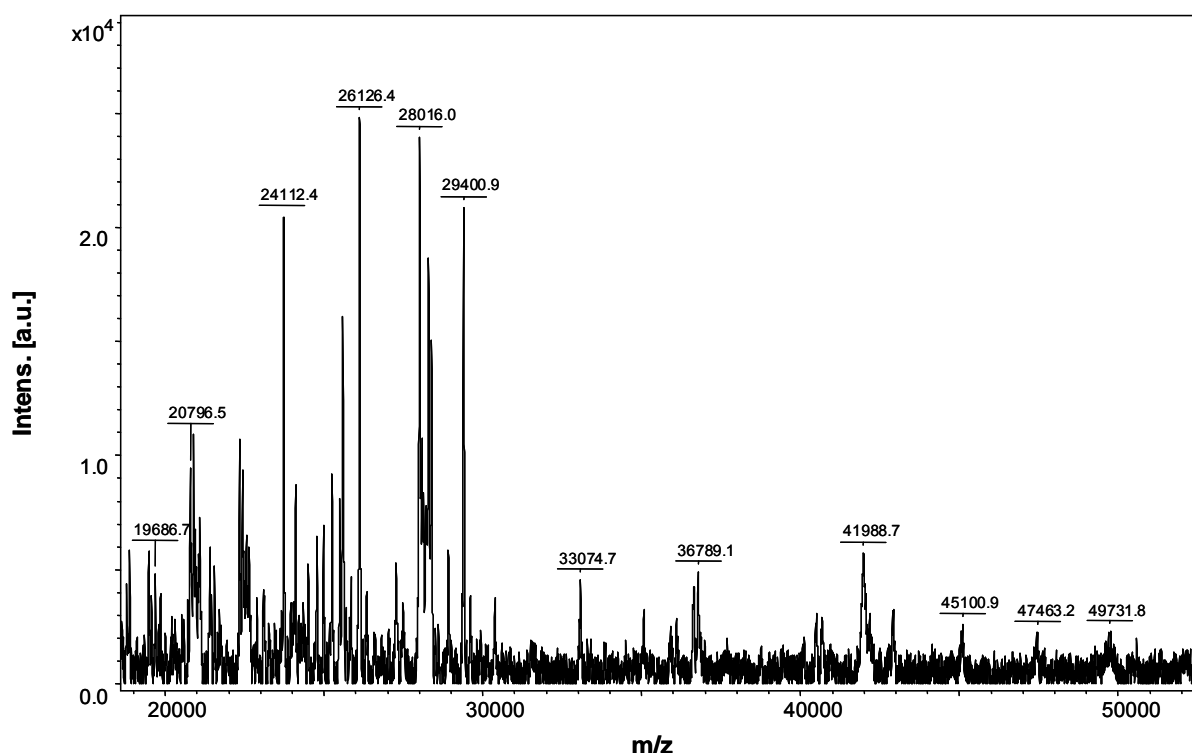


Figure 31: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes traitées par exposition aux vapeurs de TFA 10%, dépôt de TFE, dépôt de SA EtOH 20mg/mL puis SA 40mg/mL dans ACN/TFA 0.1% 7 :3

La méthode est répétée plusieurs fois, et s'avère reproductible. Ce procédé présente l'avantage de pouvoir être adapté à l'imagerie MALDI en limitant les risques de délocalisation des protéines extraites. La température d'exposition des coupes au TFA 10% doit cependant être contrôlée pour obtenir une reproductibilité parfaite de la méthode.

Utilisation de HFIP

La cocristallisation de l'analyte avec la matrice s'avère être un élément important pour leur extraction. L'Hexafluoroisopropanol (1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol, HFIP) est un solvant utilisé pour la solubilisation de protéines membranaires entières (IMP, Integral Membrane Proteins) (218). Son action sur la dénaturation des protéines est du même type que celui du TFE (215). Ce solvant a récemment été utilisé en imagerie MALDI, pour la détection de protéines dans la cornée de l'œil, telle que l'aquaporine (219). L'acide sinapinique est totalement miscible avec le HFIP. Ce solvant a donc été utilisé pour la solubilisation de l'acide sinapinique pour l'extraction et la cocristallisation de protéines hydrophobes. La première stratégie utilisée consiste en un premier dépôt d'une couche d'acide sinapinique 20mg/mL solubilisé dans le HFIP afin d'extraire et en partie d'incorporer les protéines les plus hydrophobes, puis d'une couche de SA 40mg/mL dans ACN/TFA0.1% 7 :3 v:v afin d'incorporer les protéines extraites dans les cristaux de matrices. En effet, le HFIP n'est pas un solvant permettant une cristallisation de l'acide sinapinique et une désorption des protéines optimales. De plus un bruit de fond important est généré lorsque l'analyse directe est effectuée sans ajouter une couche de matrice dissoute dans un mélange de solvants classique ACN/TFA0.1% 7 :3 v:v.

La seconde stratégie consiste en un premier dépôt de SA ACN/TFA à 40mg/mL afin de piéger les peptides et les protéines les plus polaires avant l'extraction. Puis l'incorporation des protéines les plus hydrophobes se fait par un dépôt d'une solution de SA HFIP 20mg/mL suivi d'un dépôt de matrice SA ACN à 40mg/mL. La **figure 32** montre les spectres obtenus par analyse directe MALDI des coupes après chacune de ces stratégies. Les spectres montrent les pics obtenus en fonction de la présence (**figure 32a**) ou l'absence (**figure 32b**) d'une première couche d'acide sinapinique. Les profils sont semblables entre les deux méthodes avec quelques légères différences. Certaines protéines semblent mieux extraites et d'autres

moins en l'absence d'une première couche d'acide sinapinique. Sur la **figure 32b**, les pics correspondant à des m/z compris entre 20 000 et 30 000 sont plus nombreux et possèdent une plus grande intensité. Cette observation a également été faite lorsqu'une couche de SA dans EtOH est utilisée pour la cristallisation des protéines les plus hydrophobes solvatées par le TFE (**figure 32**). Il est possible que l'incorporation des protéines dans la seconde couche de matrice dissoute dans le HFIP soit différente en fonction de l'utilisation ou non d'une première couche de SA dans le mélange ACN/TFA0.1% pour le piégeage des protéines les plus hydrophiles. Dans le cas où seules deux couches de matrice sont déposées (première stratégie), l'acide sinapinique pourrait piéger les protéines de hautes masses moléculaires les plus hydrophobes extraites en même temps que leur extraction par HFIP. Les protéines préférentiellement extraites avec la première stratégie seraient plus hydrophobes que celles extraites avec la seconde.

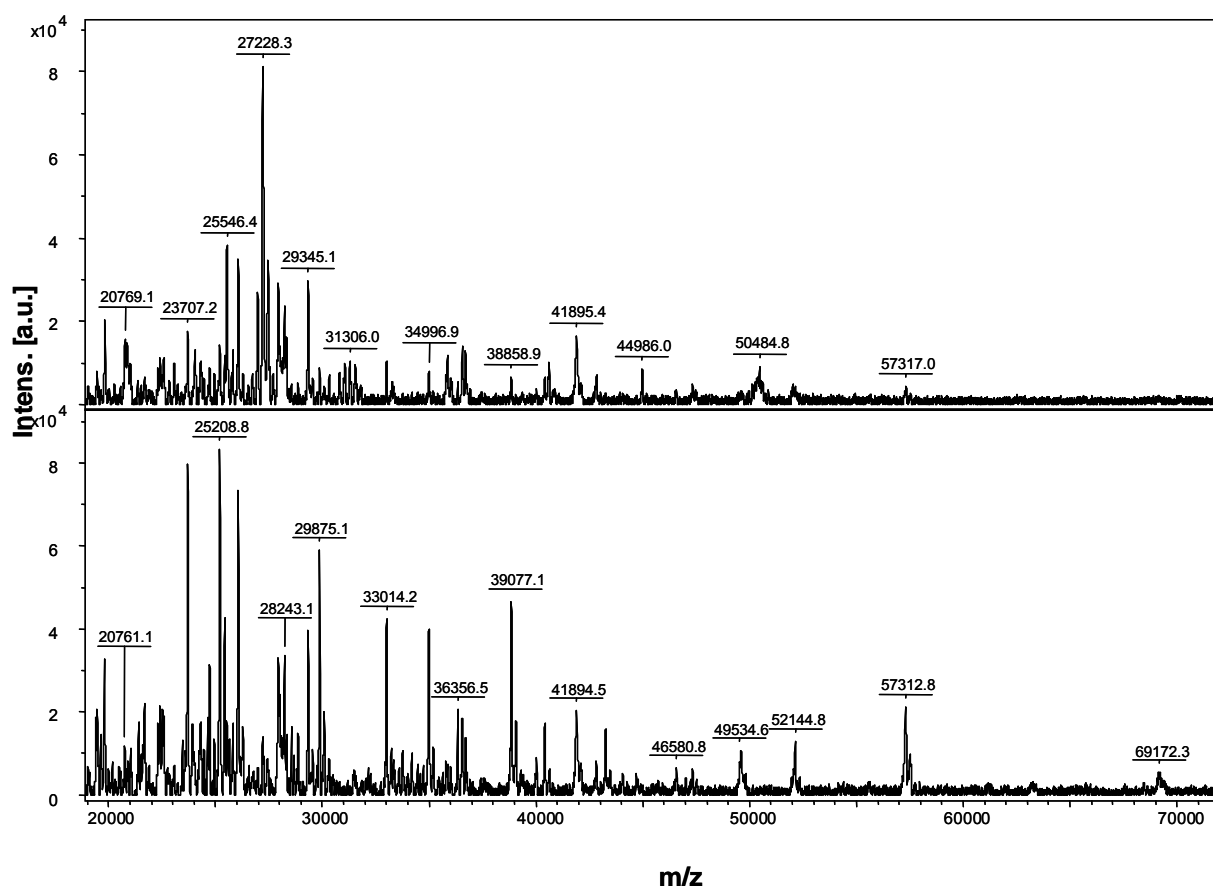


Figure 32: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes traitées par trois couches de matrice : SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3, SA HFIP, SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3 (a), et deux couches de matrice : SA HFIP, SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3 (b).

Application de la méthode à des échantillons de cancer de l'ovaire.

La procédure d'extraction de protéines de hautes masses moléculaires a pu être appliquée à des échantillons tissulaires du cancer de l'ovaire. Les résultats sont présentés dans l'article ci-joint (article 1) ainsi que l'ensemble des résultats sous forme de spectres bruts.

En conclusion, l'analyse des hautes masses peut être réalisée de façon consécutive avec celles des peptides. En effet, il est tout à fait possible de réaliser l'analyse des composés de basses masses dans un premier temps puis celle des hautes masses après avoir réalisé le traitement au TFE ou au HFIP pour avoir accès aux protéines de hautes masses. De plus, comme mentionné dans l'article, les protéines détectées dans le cancer de l'ovaire par cette technologie semblent très proches de celles trouvées en gels 2D-PAGE mais tout en gardant la localisation de celles-ci dans le tissu.

Pour vérifier cette hypothèse, des études en gel 2D-PAGE des protéines extraites par HFIP ont été réalisées et celles-ci ont été analysées de façon classique *i.e.* par digestion sur gel, puis analyse par MALDI TOF, pour une identification en mode MS par empreinte peptidique et validation en mode MS/MS. Dans ce contexte, des protéines connues pour être impliquées dans le cancer de l'ovaire ont été mise en évidence comme l'annexin A5. Cela montre donc la complémentarité entre les techniques et l'apport de l'analyse sur coupes par rapport à une extraction d'un organe entier. La localisation précise de la zone tumorale en MSI après PCA et clustering suivi d'une procédure d'analyse des protéines de hautes masses permet de conserver la localisation spatiale des protéines identifiées et donc de les corrélérer avec la pathologie. Ces résultats sont présentés dans la partie suivante du manuscrit.

3.1.2. Combinaison du profiling de protéines de hautes masses moléculaires sur coupes de tissus avec l'approche d'électrophorèse bidimensionnelle pour l'identification

L'utilisation du HFIP comme solvant de solubilisation de la matrice présente l'ultime avantage de permettre l'analyse d'une gamme de masse de protéines plus large, de hautes masses moléculaires sur coupes de tissu. A ce jour, aucun autre solvant de solubilisation de la matrice ne permettait d'extraire les composés d'un rapport masse/charge supérieur à 30000. Désormais, en combinaison avec l'utilisation de détecteurs de hautes masses moléculaires, il est possible d'accéder à la composition tissulaire de protéines de m/z jusqu'à 100kDa. Cependant, il est toujours impossible de procéder à l'identification de ces protéines. En effet, l'analyse TOF ne permet pas la fragmentation pour la caractérisation des protéines dans leur état natif. Arrivé à ce niveau d'investigation, l'objectif a donc été de combiner d'autres approches protéomiques pour permettre l'identification des protéines de hautes masses moléculaires en parallèle à leur détection sur coupes de tissus.

Il a été nécessaire de procéder à la décomplexification de l'échantillon protéique. Il existe plusieurs méthodes pour la séparation de protéines de hautes masses moléculaires. Les approches d'HPLC nécessitent des colonnes à courtes chaînes carbonées, ne permettant qu'une faible rétention des protéines, pour une meilleure élution de celles les plus hydrophobes, soit les protéines de plus hautes masses moléculaires. Ces colonnes permettent malheureusement rarement une élution de protéines de masses moléculaires supérieures à 50kDa (220). Des développements ont récemment permis l'analyse de protéines membranaires solubilisées dans des détergents mais ne permettent pas l'utilisation de solvants hydrophobes d'intérêt pour une utilisation pour profiling sur coupes de tissu (221).

L'approche qui apparaît alors la plus adaptée à la séparation des protéines de hautes masses moléculaires apparaît alors être l'électrophorèse bidimensionnelle. En effet, les méthodes en gel permettent une séparation de protéines allant jusqu'à 200 kDa. De plus, des développements de cette approche permettent la séparation des protéines uniquement en fonction de leur masse moléculaire. Ces méthodes consistent à la production de gels bidimensionnels diagonaux. Une première dimension va consister à la séparation des protéines avec un premier détergent et la seconde dimension avec une deuxième. La

différence des propriétés électrophorétiques de ces détergents permettra d'obtenir une distribution des protéines sur la diagonale du gel. Il a été démontré que la combinaison des détergent CTAB et SDS permet la meilleure répartition des protéines par rapport à d'autres combinaisons (222).

L'objectif des travaux suivants a donc été de tirer profit de ces derniers développements afin d'améliorer notre compréhension de l'action du solvant HFIP sur la solubilisation des protéines. La méthode d'extraction sur coupe fonctionnant pour des tissus de cancer de l'ovaire, nous avons décidé d'appliquer cette méthode directement à ce modèle.

Cette combinaison a donc été utilisée pour comparer les capacités d'extraction des différents solvants et mélanges de solvants utilisés pour les expériences de profiling par spectrométrie de masse sur tissu. Pour comparer les différentes capacités d'extractions des solvants, un nombre égal de coupes alternatives d'un tissu a été récolté et séparé en deux échantillons.

Deux conditions d'extraction ont alors été comparées. La première consiste à l'application du mélange de solvants ACN/TFA 0.1% 7 :3, utilisé comme mélange classique pour la solubilisation de la matrice et l'extraction des protéines lors d'acquisition d'images MALDI classiques.

Le deuxième échantillon est soumis à une solubilisation des protéines avec le solvant HFIP, utilisé pour le profiling de protéines de hautes masses moléculaires sur coupes de tissus.

Pour chacun des échantillons, un gel 2D a été réalisé séparément. En utilisant l'approche de gel en diagonal, une large quantité de protéines de hautes masses moléculaires peut être séparée si celles-ci sont présentes dans l'échantillon. Le résultat de la séparation des protéines dans chacune des conditions est présenté dans la **figure 33**.



Figure 33: Résultats de séparations en électrophorèse bidimensionnelle des protéines extraites avec un mélange ACN/TFA0.1% 7 :3 (a) et avec le solvant HFIP (b)

Ces résultats prouvent sans équivoque que le pouvoir d'extraction de HFIP par rapport à un mélange de solvants classique est bien supérieur. On démontre également par ce biais que les protéines d'un tissu peuvent tout d'abord être pré solubilisées avant une séparation par électrophorèse bidimensionnelle dans des solutions de détergents. Ce solvant est donc complètement compatible pour diverses approches protéomiques.

Afin de définitivement prouver que la combinaison des méthodes était efficace pour une identification des protéines de hautes masses moléculaires, la digestion des spots obtenus après séparation des protéines présolubilisées dans le HFIP a été réalisée. Les protéines identifiées dans à chaque position dans le gel sont présentées dans la **figure 34**.

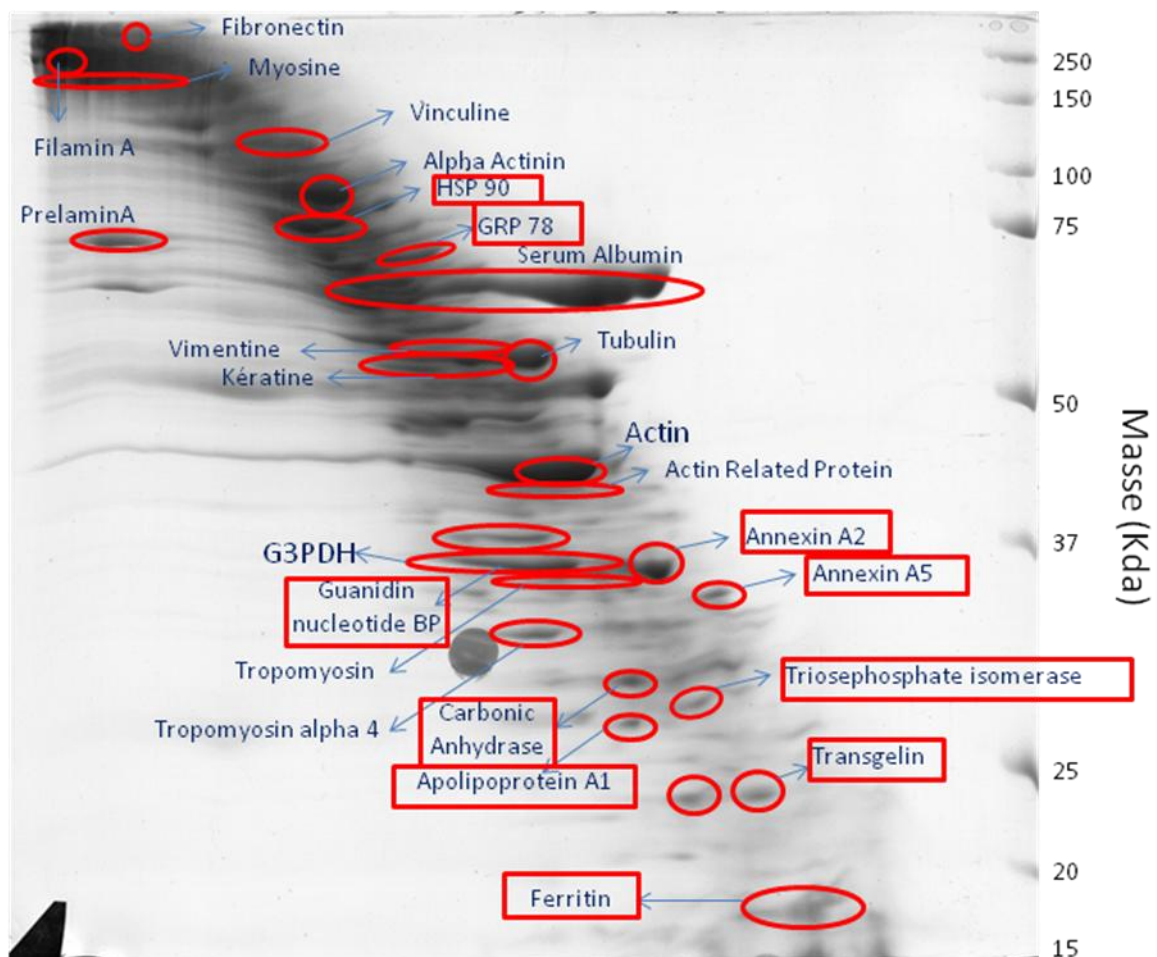


Figure 34: Identification des protéines présolubilisées dans le solvant HFIP. Les protéines correspondant à des biomarqueurs du cancer de l'ovaire référencés sont encadrées en rouge.

La **figure 34** montre que la majeure partie des protéines identifiées dans le gel sont des protéines majoritaires. Cependant, certaines protéines identifiées sont des protéines

référéncées comme étant des biomarqueurs du cancer de l’ovaire. Dans le **tableau 3** sont reportées les principales fonctions des biomarqueurs trouvés ainsi que quelques unes de leurs références dans la littérature.

Marqueur	Fonction dans le cancer de l’ovaire	Références
Annexin A2	Réarrangements du cytosquelette Médiateur de l’activation du plasminogène Migration cellulaire Prolifération cellulaire Adhésion cellulaire	(223), (83, 224-228)
Annexin A5	Apoptose	(229)
Apolipoprotéine A1	Transport lipidique	(230-235)
Carbonic Anhydrase	Prolifération cellulaire Régulation du pH Communication intercellulaire Adhésion cellulaire	(236-238)
Ferritin	Stockage du fer	(239-241)
GRP78	Chaperonne	(242, 243)
HSP90	Chaperonne	(244-247)
Transgelin	Migration cellulaire Invasion cellulaire	(224, 230, 248, 249)
Vinculin	Progression tumorale	(250)

Tableau 3: Biomarqueurs du cancer de l’ovaire trouvés dans le gel d’électrophorèse bidimensionnel.

En conclusion, cette validation prouve l’utilité de combiner différentes approches pour la détection de marqueurs de pathologie dans un contexte anatomique grâce aux méthodes d’analyses directes sur tissu, et leur identification. L’étape suivante consistera à réellement exploiter l’information de localisation moléculaire apportée par les analyses sur coupes de tissus afin de déterminer les marqueurs des régions pathologiques d’une biopsie grâce à des analyses PCA et d’utiliser l’approche par gel pour identifier les protéines extraites sur coupe. Cette perspective est illustrée dans la **figure 35**.

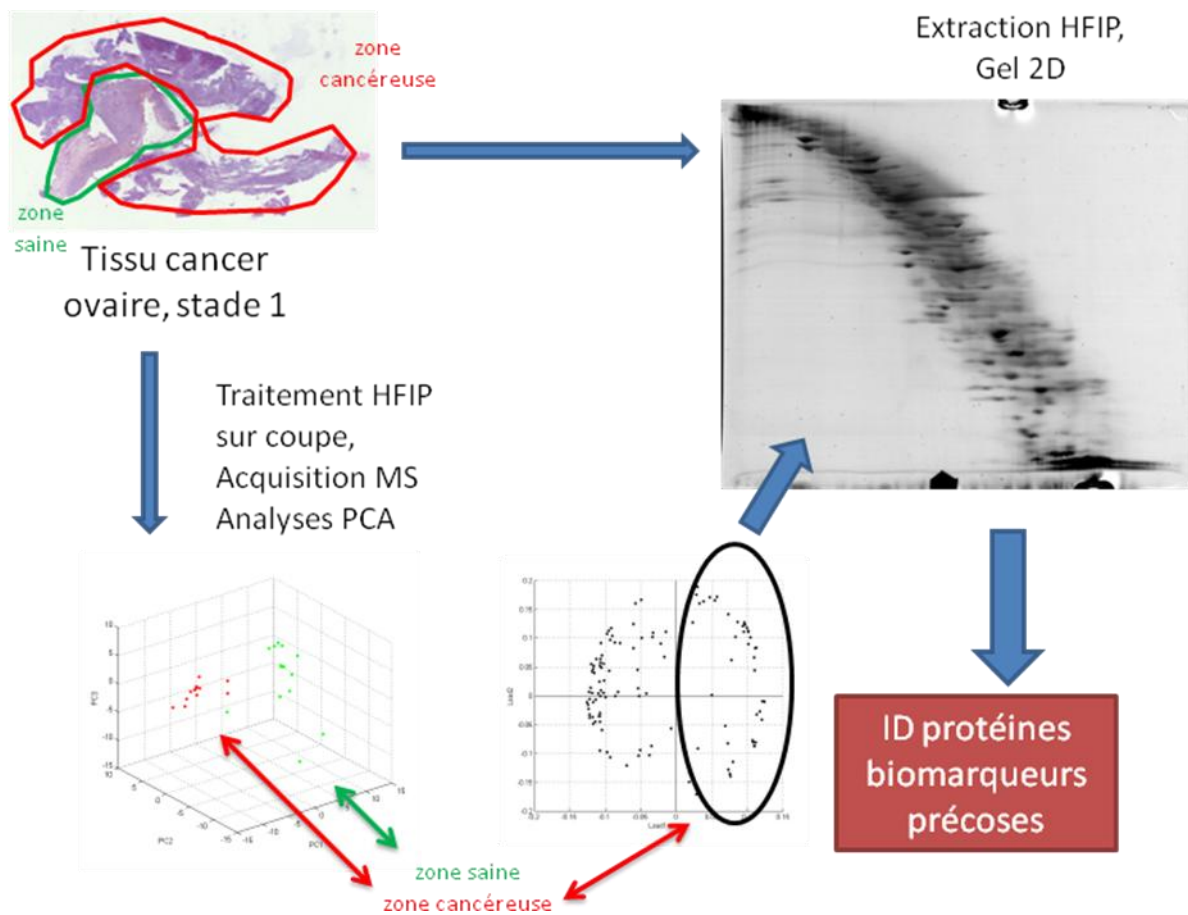


Figure 34: Perspectives pour la réalisation d'analyses moléculaires sur tissu et en gel d'électrophorèse bidimensionnelle.

Dans le but de corrélérer totalement l'image moléculaire à l'identification des protéines de hautes masses, il a fallu développer une stratégie intégrant l'utilisation d'un détecteur de haute masse. C'est ce que nous avons réalisé dans l'article 2 :

3.1.3. Imagerie des protéines de hautes masses moléculaires

Avec un détecteur classique de type MCP (Micro Channel Plate), la détection des ions se fait par une conversion des ions en électron et amplification du signal électronique généré. Les ions de hauts rapports m/z ont un trajet lent dans le tube de vol, ils arrivent à une vitesse minimale à la fin de leur parcours. Ceci défavorise la conversion des ions en électrons au sein du détecteur. La technologie CovalX permet la conversion des ions volumineux en ions de plus petite taille, leur accélération puis leur conversion en électron pour leur détection. Une analyse directe pour des concentrations de matrice déposées de 20mg/mL et 40mg/mL est effectuée avec AutoFlexIII. Avec cet appareil, la concentration optimale d'acide sinapinique pour l'obtention des meilleurs rapports signal/bruit est de 20 mg/mL. L'AutoFlex est donc plus sensible que l'Ultraflex. Cette différence de sensibilité entre les deux appareils peut être expliquée par une meilleure sensibilité due à la plus petite longueur du temps de vol de l'AutoFlex, l'absence de cellule Lift et de réflecteur dans cet appareil, qui peuvent entraîner une perte d'ions dans l'UltraFlex.

La **figure 36** montre les spectres obtenus pour une analyse directe d'une coupe avec le détecteur MCP (**figure 36a**) et avec le détecteur CovalX (**figure 36b**). Les pics obtenus sont deux fois plus intenses avec le détecteur CovalX qu'avec le détecteur MCP.

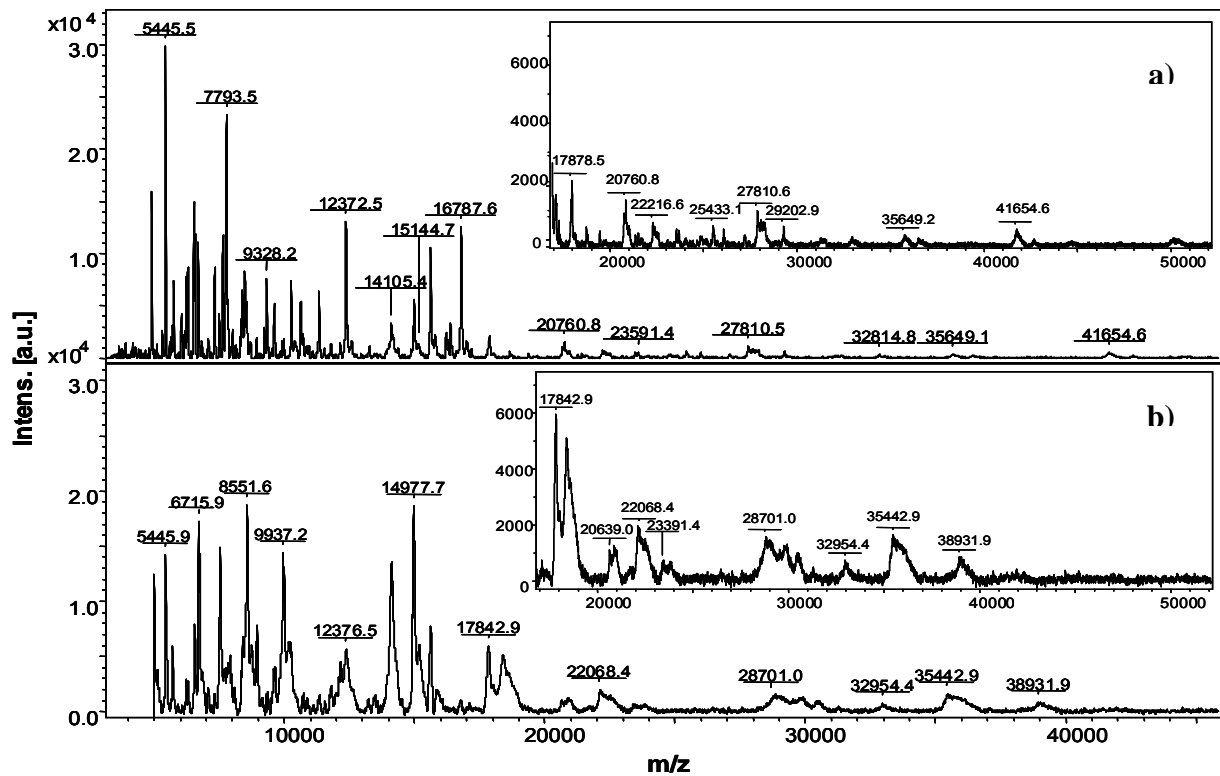


Figure 36: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes sur AutoFlexIII avec le détecteur MCP (a) et le détecteur CovalX (b)

Le détecteur de hautes masses moléculaires CovalX est beaucoup plus sensible que le détecteur MCP mais les signaux obtenus avec cet appareil sont très peu résolus. La seconde stratégie pour le traitement des coupes avec HFIP est choisie pour essayer le couplage du procédé d'extraction des protéines des hautes masses moléculaires avec la technologie CovalX. La **figure 37** montre les spectres obtenus pour l'analyse directe avec les détecteurs MCP (**figure 37a**) et CovalX (**figure 37b**) des coupes traitées. Les pics correspondants à des m/z élevés sont plus de 50 fois plus intenses, avec le CovalX par rapport au détecteur MCP.

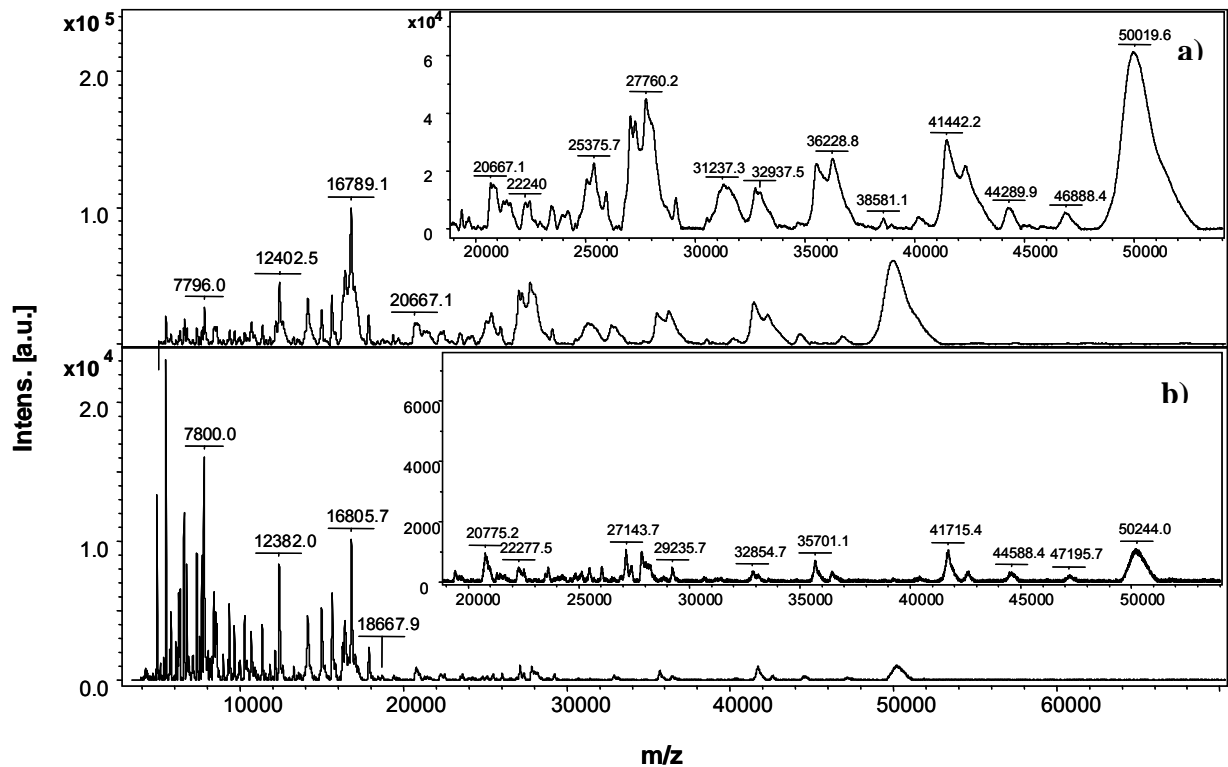


Figure 37: Spectres de masse obtenus pour l'analyse directe de coupes traitées par dépôt de trois couches d'acide sinapinique : SA 40mg/mL ACN/TFA0.1%7 :3, SA HFIP, SA 40mg/mL ACN/TFA0.1% 7 :3 ; sur AutoFlexII avec le détecteur MCP (a) et le détecteur CovalX (b)

Des développements restent cependant encore à faire dans les méthodes de traitement permettant d'obtenir des protéines de hauts poids moléculaire, notamment pour trouver des moyens de l'appliquer sans entrainer de délocalisation. Néanmoins, une image de protéines sur une coupe sans traitement a été réalisée avec l'AutoFlexIII et le détecteur CovalX. La **figure 38** montre des protéines de haute masse localisées dans des zones spécifiques du cerveau de souris. Mais le nombre de molécules détectées à cette gamme de masse reste faible. Une protéine d'environ 69 KDa est localisée dans le 3^e ventricule et à la périphérie du tissu. Une autre d'environ 46850 Da est localisée dans le cortex cérébral et une de 44600 Da dans le noyau cérébral et le bulbe rachidien.

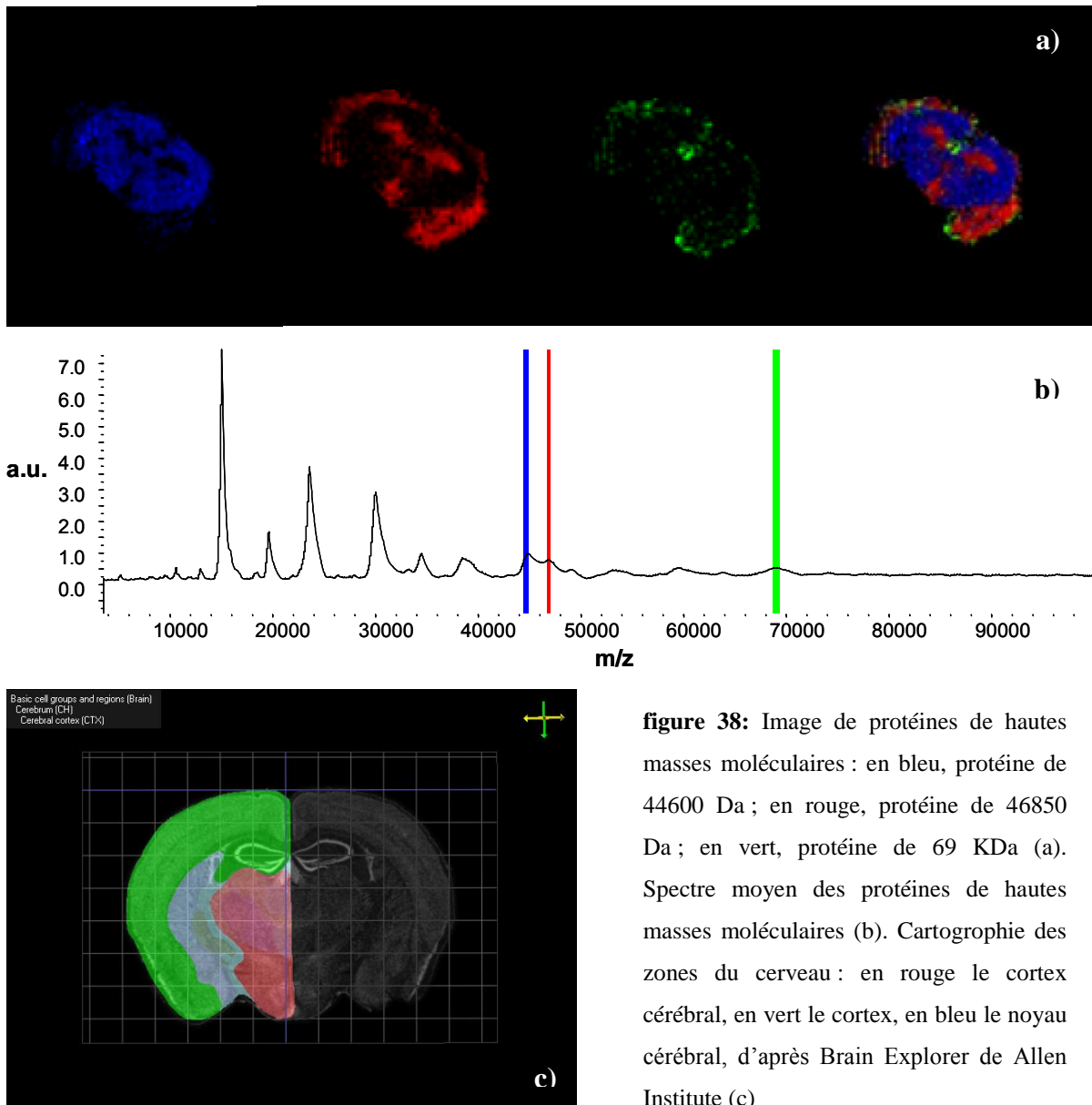


figure 38: Image de protéines de hautes masses moléculaires : en bleu, protéine de 44600 Da ; en rouge, protéine de 46850 Da ; en vert, protéine de 69 KDa (a). Spectre moyen des protéines de hautes masses moléculaires (b). Cartographie des zones du cerveau : en rouge le cortex cérébral, en vert le cortex, en bleu le noyau cérébral, d'après Brain Explorer de Allen Institute (c)

Ces résultats ouvrent des perspectives importantes pour l'imagerie MALDI. En effet, le couplage du détecteur CovalX avec les techniques d'extraction des protéines grâce à l'utilisation des solvants hydrophobes pourrait dans un avenir proche être compatible avec certains instruments de dépôt automatique de la matrice et devrait permettre l'imagerie des protéines de hautes masses moléculaires. Cette imagerie des hautes masses pourrait permettre la traçabilité des anticorps thérapeutiques par exemple dans le cas de suivi de traitement de pathologie. La corrélation et l'identification des protéines de hautes masses va également permettre d'améliorer la détection en multiplex de plusieurs biomarqueurs lors d'analyses de biopsies extemporanées en vue d'améliorer le diagnostic des patients.

**Partie 2 : Des développements des outils analytiques à la
validation de biomarqueurs du cancer de l’ovaire**

Dans le chapitre précédent, a été présentée la manière dont nous avons pu développer une méthode afin d'améliorer l'extraction des protéines de hautes masses moléculaires à partir de coupes de tissus. Cette méthode permet d'élargir la gamme de masse d'analyse des protéines. Elle est disponible et applicable à n'importe quel tissu, pour n'importe qu'elle problématique. Il a alors été possible de l'utiliser pour l'exploration du contenu moléculaire des différents types de cancer de l'ovaire épithéliaux. C'est le but d'une majeure partie de mon doctorat présentée dans ce chapitre.

Afin de commencer la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire, il a été utile de récolter un nombre suffisant de tissus. Les tissus obtenus peuvent être sous deux formes de conservation: ils peuvent être frais et congelés et dans ce cas, ils sont directement prélevés auprès de la patiente opérée en bloc opératoire. Dans le second cas de figure, les tissus proviennent des banques hospitalières et sont fixés à la formaline et inclus dans des blocs de paraffine. Dans les deux cas de figure, un comité d'éthique doit évaluer le ratio (utilité du prélèvement pour la recherche)/(risque pour le diagnostic de la patiente) associé au prélèvement afin de vérifier que celui-ci n'est pas nuisible au travail de diagnostic anatomo-pathologique. La collecte de tissu se fait après une explication éclairée du protocole de recherche à la patiente.

Dans cette deuxième partie du manuscrit, sont présentés les différents aspects des développements d'outils statistiques pour la recherche de biomarqueurs de pathologie, à partir de données spectrales obtenues dans un contexte anatomique. Nous verrons comment il a été possible de combiner l'utilisation de ces calculs aux développements d'extraction des protéines de hautes masses moléculaires sur coupes de tissus précédemment présentés. Enfin, nous verrons comment l'utilisation de l'ensemble de ces développements permet la validation de ces différents biomarqueurs pour une utilisation en anatomo-pathologie, à des fins diagnostiques.

Publications 3, 4 & 5:

Bonnel D, Longuespée R, Franck J, Roudbaraki M, Gosset P, Day R, Salzet M, Fournier I. Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer. *Anal Bioanal Chem.* (2011)

401(1):149-65

El Ayed M, Bonnel D, Longuespée R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M. MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Med Sci Monit.* (2010) 16(8):BR233-45

Longuespée R, Boyon C, Castelier C, Jacquet A, Desmons A, Kerdraon O, Vinatier D, Fournier I, Day R, Salzet M. The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling. *Histochem Cell Biol.* (2012) 138(1):141-54

3.2.1. Développement d'outils statistiques pour l'analyse en bottom-up et top down des images MALDI

Objectif 1:

Cette partie est dévolue à l'utilisation d'outils statistiques pour l'analyse des informations relatives à l'analyse par imagerie MALDI. L'information spectrale est tellement complexe que des supports statistiques sont nécessaires pour la discrimination des groupes et sous groupes moléculaires au sein même d'une coupe de tissu. Il a été nécessaire d'adapter des méthodes de calculs par analyses en composante principale et de classifications hiérarchiques pour une utilisation pour des données d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. Les résultats sont reportés dans l'article 3.

La détermination de marqueurs spécifiques d'un stade physiopathologique nécessite donc l'utilisation d'outils statistiques pour la comparaison des informations spectrales de différentes provenances. La première méthode de calcul pour la comparaison des spectres est l'analyse en composante principale qui permet d'accéder aux m/z discriminant d'une région ou d'une autre du tissu (cf généralités). Cette méthode de calcul peut être appliquée directement aux informations spectrales d'une acquisition en imagerie MALDI. Il est alors possible de remonter aux informations moléculaires qui permettent de discriminer les régions histologiques les unes des autres. Cependant, l'interprétation des résultats est parfois fastidieuse dans la mesure où une forte disparité moléculaire est requise pour discriminer les pics d'une région par rapport à une autre. Afin de palier à ce problème, il est possible d'utiliser une approche en deux étapes, appelée PCA-SDA (Symbolic Discriminant Analysis). La première étape permet de classer les sous-régions du tissu en fonction de leur contenu moléculaire. Cette étape est permise grâce au clustering hiérarchique. Ce type de calcul permet de déterminer des signaux discriminants entre deux échantillons qui serviront à créer des fonctions qui seront une base pour la classification d'autres sous types cellulaires. Les différents types d'approches sont illustrés dans la **figure 39**.

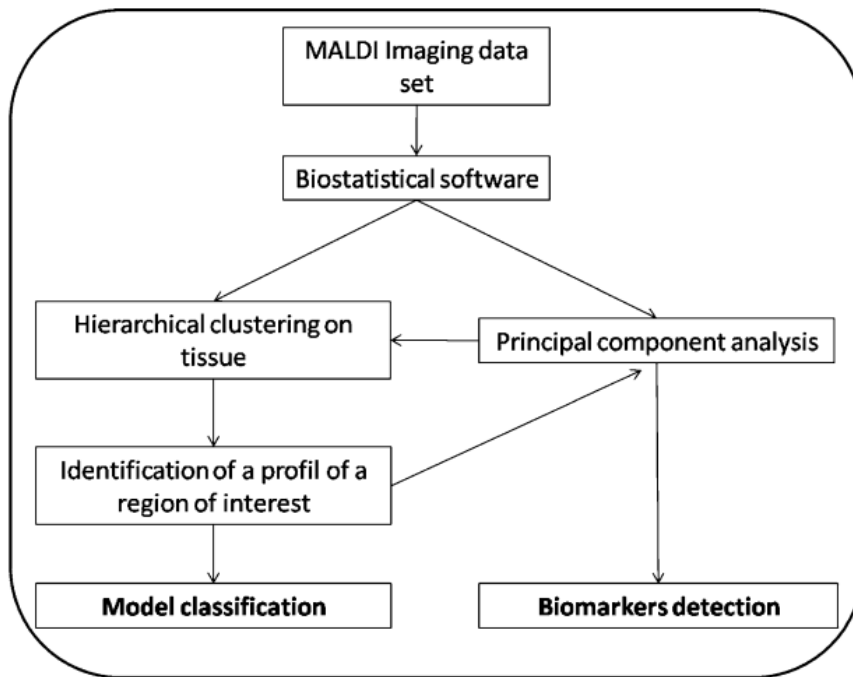


Figure 39: Différentes voies d’investigation pour l’analyse de tissus pour la recherche de biomarqueurs

L’analyse par clustering hiérarchique permet d’obtenir un dendrogramme où chaque branche constitue un niveau de discrimination. Dans chaque branche principale est contenue l’information de sous classification tissulaire. Grâce à l’utilisation du logiciel ClinProTools, cette classification est visualisable sous forme d’image où chaque sous type tissulaire classé peut être représenté par une couleur, superposable à une image optique.

La méthode de classification hiérarchique a tout d’abord été testée sur cerveau de rat, cet organe présentant des zones histologiques facilement différenciables. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 40**.

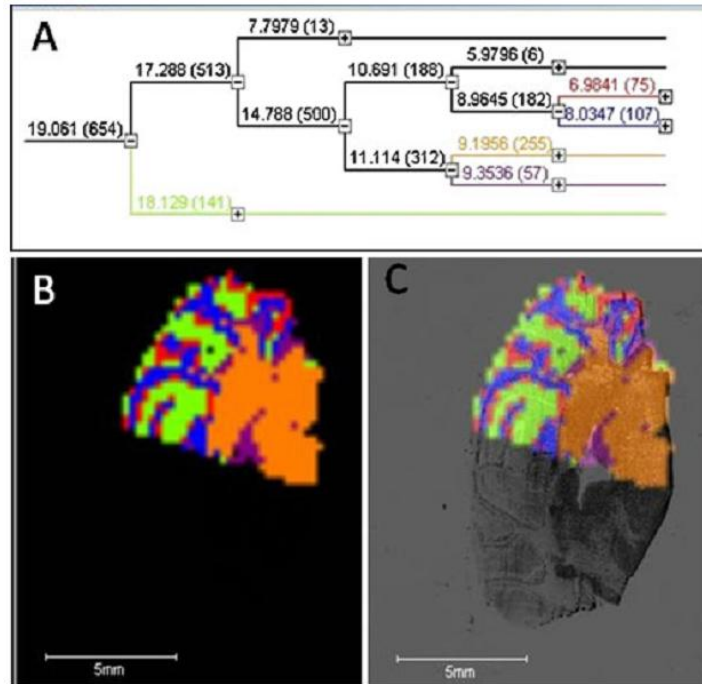


Figure 40: Résultats obtenus de l'analyse de classification hiérarchique d'une image de tissu digéré à la trypsine. (a) dendrogramme de classification des spectres (b) image des sous groupes moléculaires retrouvés (c) Superposition de l'image des « clusters » avec l'image optique du tissu.

La deuxième étape de la PCA SDA est l'analyse par PCA des zones de tissu d'intérêt déterminées par des régions d'intérêt (ROI), discriminées par clustering hiérarchique. L'analyse est alors plus aisée car elle permet de ne comparer l'information spectrale que d'un nombre de sous types tissulaires voulu. Deux types d'informations sont alors obtenus: la discrimination des spectres et la discrimination des pics qui permettent la différenciation des spectres. Les résultats de cette seconde analyse sont présentés dans la **figure 41**.

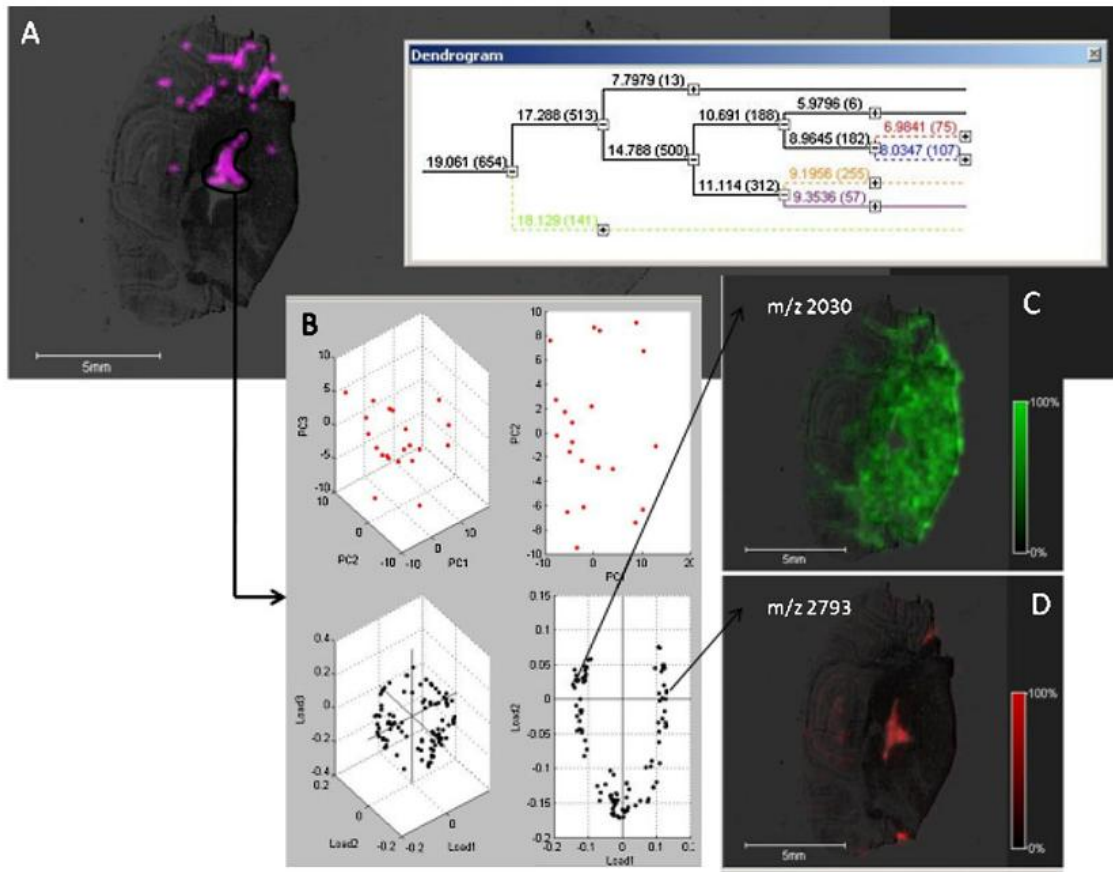


Figure 41: Corrélation des données de classification hiérarchique et d'analyses PCA. Image d'un cluster (a), analyse PCA (b), images de pics différenciés par la PCA (c, d)

Des étapes de validation de la méthode ont ensuite été réalisées afin de déterminer si celles-ci étaient réalisables pour des approches top down ou bottom up. Pour ce faire, la réalisabilité de l'étape de clustering hiérarchique a été vérifiée pour les peptides protéolytiques de coupes de cerveau ayant été soumises à digestion trypsique. La méthode a également pu être testée sur des peptides dérivés au tris(2,4,6-triméthoxyphényl)phosphine (TMPP), un composé qui permet d'améliorer l'efficacité de la fragmentation des peptides. Les résultats de la validation de cette étape sont illustrés dans l'article 3.

Nous avons développé une méthode d'analyse en top down des protéines tissulaires. Celle-ci repose sur l'utilisation d'une matrice spécifique, la 1,5 DiAminoNaphthalen (1, 5 DAN) qui va orienter la fragmentation des protéines via leurs extrémités Cterminales immédiatement après leur désorption et la formation d'ions de fragmentation de type c et z. Ce type de fragmentation opère au niveau même de la source MALDI, d'où l'appellation du

processus de fragmentation « In Source Decay » (ISD). Nous avons également élaboré une matrice ionique fabriquée sur la base de la 1,5 DAN, la 1,5 DAN/Camphre. L'adduit d'un dérivé cyclique terpenoïque a en effet permis l'obtention de signaux spectraux plus intense qu'avec la 1,5 DAN seule. En plus d'une meilleure sensibilité pour l'analyse, son homogénéité de cristallisation a permis son dépôt de manière plus aisée et d'obtenir une meilleure reproductibilité de résultats.

La méthode de clustering hiérarchique a également être pu être utilisée sur des images ISD, avec le dépôt de la 1,5 DAN via le microspotting grâce au CHIP 1000 et le sprayage grâce à l'ImagePrep. Ces résultats sont présentés dans la **figure 42**, ci-dessous.

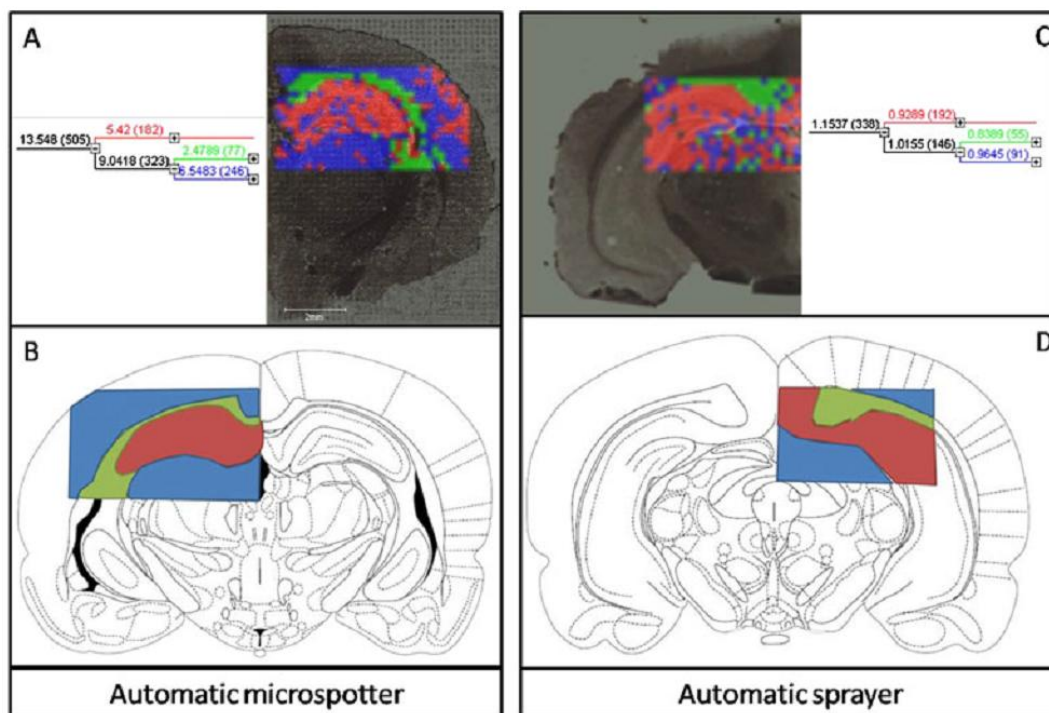


Figure 42: Images des sous types moléculaire retrouvés sur coupes de cerveau de rat après analyses par classification hiérarchique et comparaison avec les régions morphologiques, après images ISD, via le microdépôt (a, b), ou micronébullisation (c, d)

Les pics détectés correspondent majoritairement aux fragments ISD de myéline. Les régions histologiques sont différenciées en fonction de l'abondance relative de cette protéine dans les différentes zones du cerveau de rat. Ces essais permettent de valider la technique de PCA SDA pour les différentes approches de bottom up et top down utilisées en imagerie par spectrométrie de masse. Cette approche a ensuite pu être testée sur un modèle de pathologie.

Le modèle utilisé ici est le cancer de la prostate. Le tissu à disposition comportait différentes classes de tissus. L'une était composée de tissu tumoral et une autre était composée de stroma et d'acini. Une première analyse d'imagerie MALDI a été effectuée dans chacune de ces régions et le calcul de clustering hiérarchique réalisé pour la différenciation de celles-ci sur la base de leur contenu moléculaire. Comme illustrés dans la **figure 43** ; la classification hiérarchique montre une différenciation des tissus en deux couleurs, suggérant une signature moléculaire spécifique pour chaque type de tissu. L'étape suivante d'utilisation du clustering hiérarchique fut de déterminer l'affiliation de tissu de nature non connue sur la base d'une prédiction apportée par les analyses précédentes. Deux régions d'intérêt ont alors été déterminées et des images moléculaires ont été réalisées sur ces zones. Les informations spectrales ont alors été intégrées au calcul de classification hiérarchique précédemment effectué. Il a alors été possible d'affilier les tissus à un statut bénin ou cancéreux en fonction de la couleur affichée. La première région d'intérêt apparut être un mélange de tissus cancéreux et bénins alors que la deuxième région d'intérêt pouvait être différenciée par une autre couleur, correspondant donc à un autre profil moléculaire, suggérant que le tissu est d'une nature différente des deux autres tissus analysés.

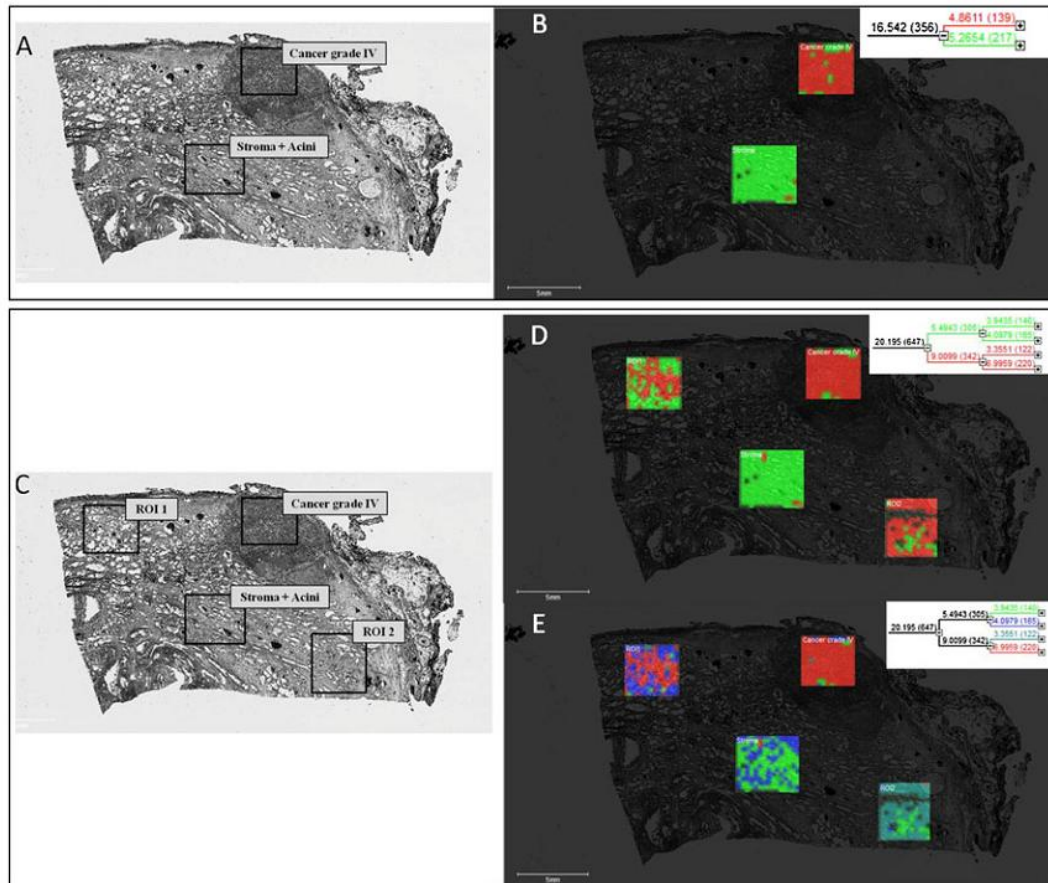


Figure 43: analyse de classification hiérarchique sur biopsies de cancer de la prostate. Classification de tissu s de nature connue (a, b) et classification de la nature de tissu grâce à la première classification (c, d, e)

Une analyse PCA a ensuite pu être réalisée à partir des zones différenciées de départ, cancéreuse et saine. Une liste de pics discriminants de la zone cancéreuse a pu être obtenue, ces pics correspondant à des marqueurs potentiels de la pathologie. L'analyse PCA et l'identification des certains de ces marqueurs est présentée dans l'article 3.

En conclusion, ces travaux montrent la grande utilité des outils statistiques pour l'analyse de données d'imagerie MALDI. Les analyses PCA et de classification hiérarchique permettent de donner une représentation aisée des informations différentielles entre des échantillons. Les analyses PCA et de classifications hiérarchiques peuvent désormais être considérées comme les méthodes de prédilection pour des analyses sur des images seules pour la recherche de biomarqueurs. Cependant la validation de biomarqueurs nécessite de retrouver ceux-ci sur un grand nombre d'échantillons. Un autre objectif pour l'utilisation de la PCA est donc de prouver sa faisabilité pour des analyses sur de larges cohortes de tissus.

3.2.2. Recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire : application des développements d'extraction des protéines et des outils statistiques

Objectif 2 :

L'objectif des travaux suivants fût d'étendre la recherche de biomarqueurs à de larges cohortes de tissus. Cette fois ci, les analyses devaient être appliquées directement sur le modèle de pathologie du cancer de l'ovaire. Associé à cet objectif d'utilisation d'outils statistiques, la méthode d'extraction de protéines de hautes masses moléculaires sur tissus devaient également être appliquée afin d'optimiser la richesse de l'information spectrale obtenue sur une coupe de tissu. Un autre objectif a également été l'application des analyses PCA et de classification hiérarchique sur des images de cancer de l'ovaire. Le dernier objectif de l'article fût la validation des biomarqueurs via plusieurs méthodes. La première étant l'utilisation de l'approche de nano LC-MS, les autres des approches plus classiques de biochimie et d'histologie comme le western blot et l'immunohistochimie. Ces résultats sont présentés dans l'article 4.

La suite du travail consista donc à effectuer des analyses MALDI directes sur coupes afin de cibler les profils moléculaires communs à différents types de tissus tels que bénin versus cancer, à différents stades de la pathologie. La technique d'extraction de protéines de hautes masses moléculaires sur tissu a été appliquée ici afin d'élargir la gamme de masse d'analyse des composés au sein du tissu. Cette analyse peut désormais être réalisée pour les peptides, les protéines et des protéines de hautes masses moléculaires. Les résultats de ces différentes analyses sont illustrés dans la **figure 44**. Pour chacune des approches, un dépôt de matrice a été effectué manuellement, directement sur la coupe de tissu. La gamme de masse des peptides de la coupe a été obtenue grâce à l'application de la matrice HCCA. Les protéines ont été détectées après application de la matrice SA dans le mélange classique de solvants ACN/TFA 0.1% 7:3. Enfin, les protéines de hautes masses moléculaires ont été détectées grâce à l'utilisation de l'approche d'extraction de protéines de hautes masses moléculaires sur coupe reposant sur l'utilisation du HFIP comme solvant de solubilisation de la matrice. Ces méthodes ont pu être appliquées consécutivement, sur la même coupe de tissu. En effet, il est possible par cette approche de retirer la matrice utilisée pour la détection de composé d'une gamme de masse donnée, et de la remplacer par une autre, pour une analyse d'un autre type.

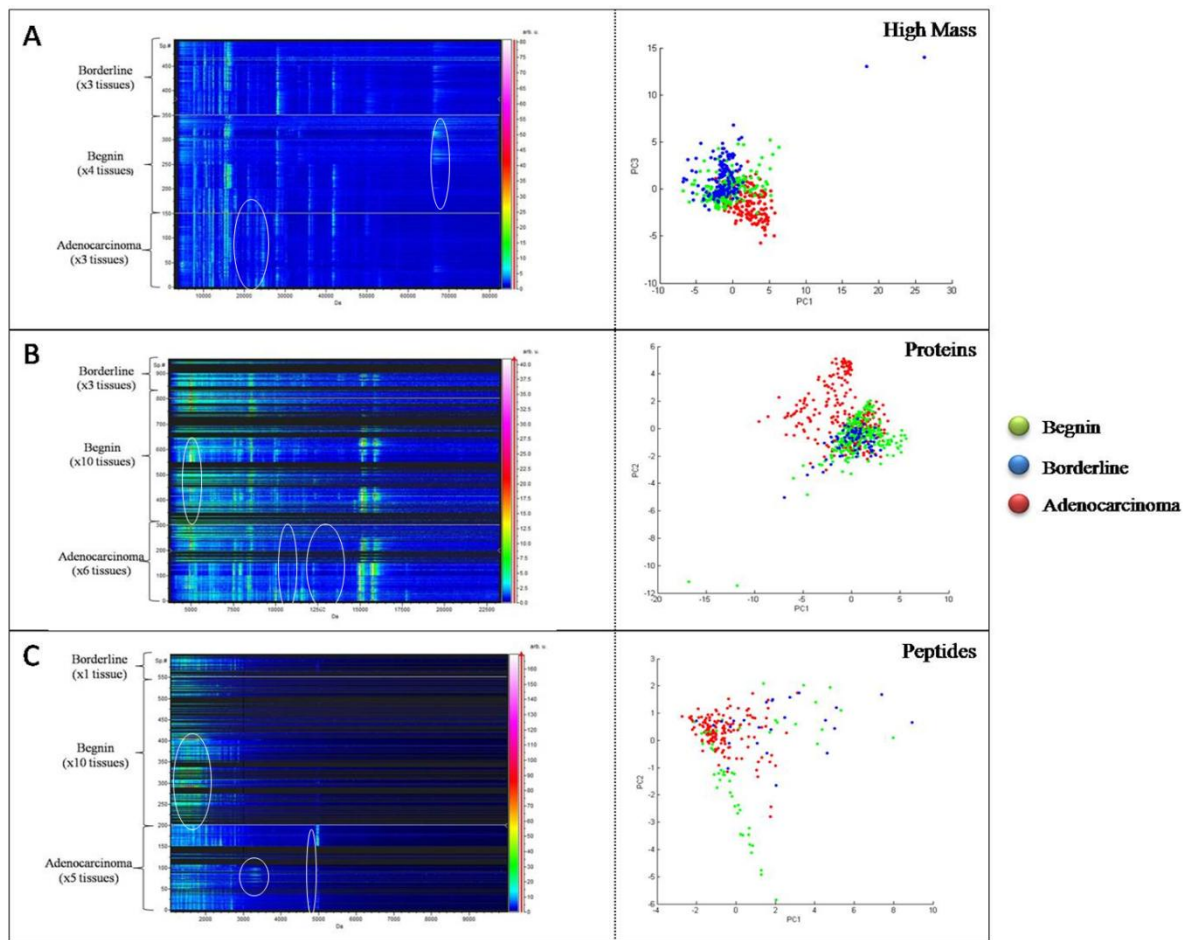


Figure 44: Détermination de signatures moléculaires des tissus bénins, borderline du cancer de l’ovaire, dans la gamme de masse des protéines de hautes masses (a), de masses intermédiaires (b) et des peptides (c)

Les résultats de l’analyse sont présentés sous deux formes. Les spectres sont tout d’abord alignés et représentés sous une forme de « pseudo gels » qui permettent de représenter l’intensité des pics des spectres de masses à des m/z donnés. Les analyses ont été effectuées sur plusieurs tissus, afin de pouvoir retrouver des marqueurs pour permettre une validation préliminaire de marqueurs d’intérêt.

L’analyse des peptides a permis de discriminer des m/z autour de 3300 et 2800 dans les tissus d’adénocarcinomes. Dans les tissus bénins, un profil était présent pour des m/z de 1200 à 2000. Pour les analyses de tissus dans les zones cancéreuses, deux profils peuvent être observés pour des m/z autour de 9500, 14000 et 17500. Entre les tissus bénins et borderline, il a été possible de discriminer une signature de m/z entre 4900 et 5200 dans les tissus bénins.

Grâce aux analyses de hautes masses moléculaires, un profil de m/z entre 23000 et 25000 a été détecté dans les tissus cancéreux, et des masses allant jusqu'à 65000 et 68000 ont été détectées dans les tissus bénins et borderline.

Ces dernières analyses démontrent donc la puissance de l'extraction des protéines de hautes masses grâce au HFIP et l'utilité de l'approche pour une recherche de biomarqueurs sur coupes de tissus. Il est également important de noter que de nombreuses positions analysées n'ont pu donner de spectre avec le dépôt de matrice classique, faute d'incorporation des protéines dans les cristaux de matrice et à cause de la faible extraction procurée par le mélange de solvants classique. Ces positions apparaissent en noir dans la représentation en pseudogel des spectres des différents groupes de tissus. Le traitement au HFIP a permis une extraction efficace de ces protéines sur toute la surface du tissu et a donc permis d'obtenir un signal pour chaque position qui avait manqué à l'analyse classique des protéines. Le traitement au HFIP pourrait donc être utilisé de manière systématique pour l'analyse de protéines de gammes de masses intermédiaires.

Le deuxième axe du travail fut d'appliquer les développements faits des analyses PCA et des classifications hiérarchiques des images MALDI au modèle du cancer de l'ovaire. Les résultats de l'analyse sont présentés dans la **figure 45**.

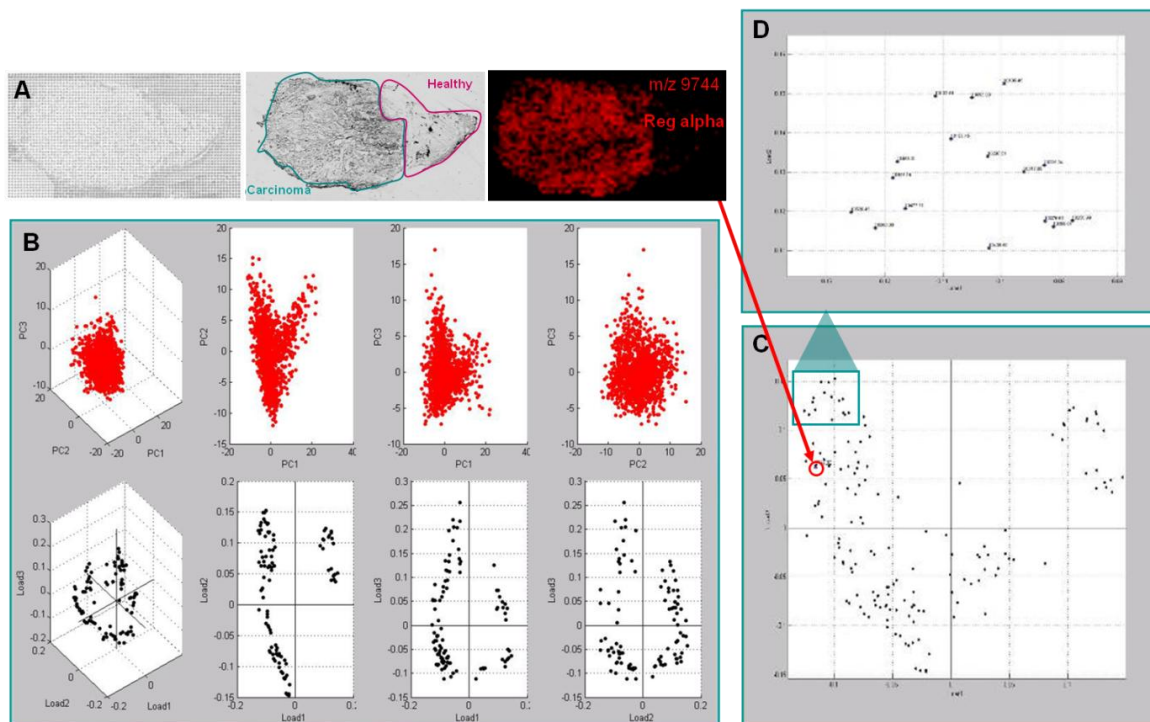


Figure 45: Analyse PCA et image du fragment cter de Regalpha. Préparation de la biopsie pour l'analyse par imagerie MALDI (a), analyses PCA de l'image (b), différentiation des pics de la zone cancéreuse et de la zone saine. (c,d), image du fragment Cterminal de Reg-alpha (a, 3e cadre)

Pour cette expérience, la matrice ionique SA/3AP (Sinapinic Acid 3 Acetyl Piridin) a été déposée par microdépôt sur toute la surface de l'une coupe de biopsie, composée de tissu sain et de tissu cancéreux. La SA/3AP est une des matrices ioniques développée au laboratoire (113) qui permet d'obtenir de meilleurs signaux MS sur coupes de tissus. L'image MALDI a été réalisée et un calcul par PCA a été effectué de manière non supervisée sur l'ensemble des spectres de la coupe. Les spectres de la zone cancéreuse ont alors pu être discriminés de ceux de la zone bénigne sur une base moléculaire. Dans ce cas précis, le faible nombre de sous types tissulaire de la coupe ne nécessitait pas de procéder à une approche de PCA SDA.

Parmi les ions discriminés dans la région cancéreuse, certains avaient des masses correspondant à des marqueurs déjà décrits dans la littérature. Un des ions correspondait au fragment C-terminal de Reg Alpha, déjà détecté par notre groupe dans des stades avancés de cancer de l'ovaire (141).

Ce marqueur, comme mentionné plus haut, apporte une nouvelle preuve de l'existence d'un phénomène d'immunosuppression dans le contexte du cancer de l'ovaire. Nous avons

alors décidé de valider ce marqueur par d'autres méthodes telles que l'immunohistochimie ou les méthodes de western blot. Cette étape de validation est présentée dans la **figure 46**.

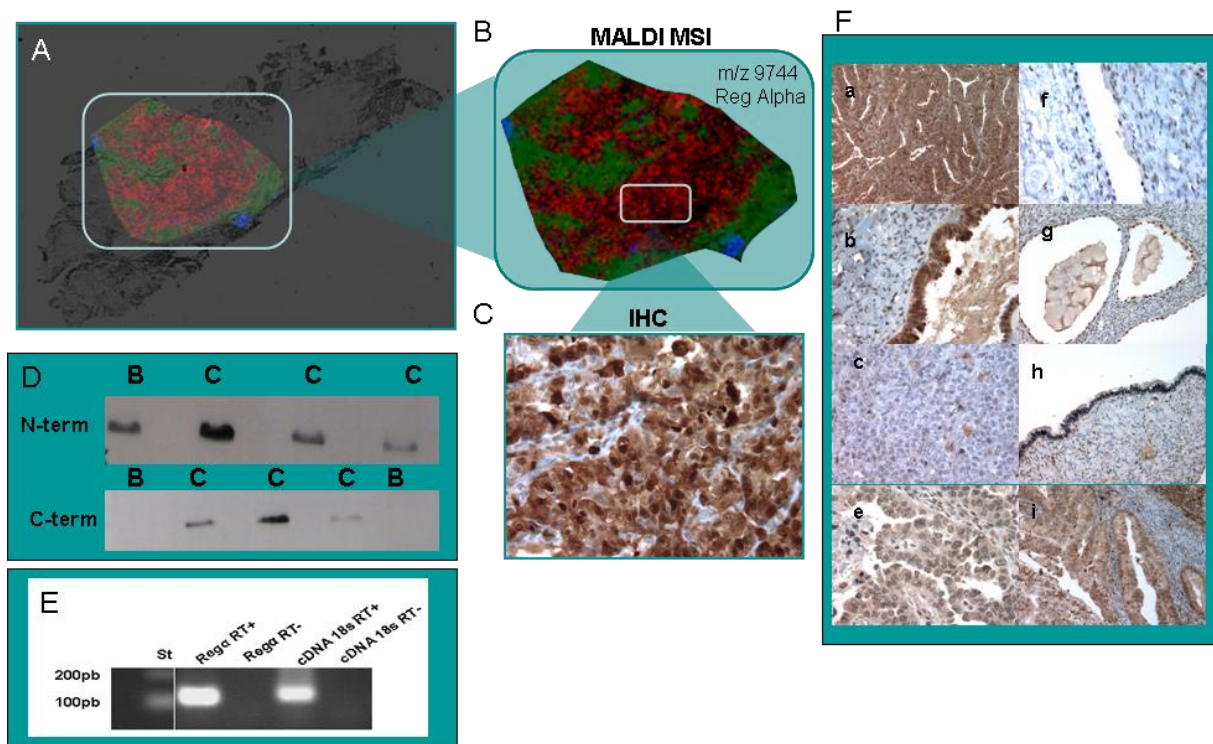


Figure 46: Validation de Reg-Alpha par imagerie MALDI (a, b), immunohistochimie (c,f), Western Blot (d), validation des transcrits de Reg-Alpha (e)

D'autres analyses d'imagerie MALDI ont pu être réalisées, où l'ion a été retrouvé spécifiquement dans les zones cancéreuses. Les expériences d'immunohistochimie sur plusieurs types de tissu ont alors permis de retrouver ce marqueur à une localisation nucléaire dans les tissus normaux et plutôt cytoplasmique dans les zones de tissus cancéreux. Les analyses en Western Blot nous ont permis de retrouver la partie N-terminale dans les échantillons bénins comme cancéreux et la partie C-terminale spécifiquement dans les tissus cancéreux. Enfin, des analyses de RT PCR ont été réalisées sur des transcrits provenant de cellules SKOV3, la lignée modèle caractéristique du cancer de l'ovaire séreux, et ont révélé sa présence au niveau transcriptomique.

Le marqueur Orosomucoïd a également pu être validé de cette façon. Les résultats sont illustrés dans la figure 5 de l'article 4.

Parmi les m/z discriminants de la région cancéreuse, certains correspondaient aux masses d'autres marqueurs déjà décrits, comme apolipoprotéine A1 et la protéine S100. L'approche de détection de protéines natives sur coupe ne permettant pas l'identification des protéines, nous avons procédé à un retrait de la matrice des tissus analysés, et à la digestion à la trypsine de ceux-ci pour une analyse en LC-MS/MS des digests tryptiques.

Cette approche a permis de trouver une série de biomarqueurs dans les tissus cancéreux qui sont listés dans le **tableau 4**. Ces marqueurs ont des masses correspondant à des signaux retrouvés par imagerie MALDI. Leur présence a pu à nouveau être validée par la suite. Les images moléculaires de ces marqueurs sont présentées dans la figure 6 de l'article 4. Ces marqueurs sont des éléments importants confirmant des mécanismes moléculaires du cancer de l'ovaire. Des protéines comme la protéine S100 contribuent à la prolifération cellulaire et l'inflammation via la migration des leucocytes. D'autres protéines sont impliquées dans des mécanismes immunologiques comme le fragment C-terminal de Reg Alpha qui révèle un phénomène d'immunosuppression dans le cancer de l'ovaire. Les protéines telles que orosomucoid, alpha1 acid glycoprotein (AGP) sont aussi associées à des mécanismes de réaction immunologique. L'apolipoprotéine A1 est aussi responsable de la baisse d'expression de certaines protéines membranaires des cellules dendritiques et stimule la production d'IL10 (143). Hemopexin induit la réduction de TNF et IL 16 des macrophages pendant l'inflammation et limite la production de cytokines induite par les Toll-like Receptors (TLR) 4 et TLR2. D'autres protéines glycosylées pourraient avoir un double rôle d'immunosuppression et de progression de la tumeur (143). C'est le cas de lumican.

Les autres protéines impliquées dans la progression tumorale retrouvées dans les échantillons sont decorin, biglycan, prolargin. Mucin 9 est une autre protéine glycosylée surexprimée dans le cancer de l'ovaire, qui est également retrouvée dans l'épithélium tubaire normal.

Un autre mécanisme mis en évidence via la détection de marqueurs est la signalisation au cytosquelette. Des protéines comme profilin-1, cofilin 1, vimentin, cytokeratin 19

contribuent au changement du phénotype cellulaire, comme la conversion des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuse. Ces mécanismes opèrent au cours du développement embryonnaire mais également dans les étapes de la métastase.

Access number	Protein name	Molecular mass	Mascot score (average)	Sequence coverage (average)
P08670_CHAIN_0	Vimentin	53651	89.6±22.3	27±10%
P51884_CHAIN_0	Lumican Precursor	38428	63.6±5.7	19.3±4%
P02647_CHAIN_1	Apolipoprotein 1	11183	49.9±4	21.6±4.9%
P51888_CHAIN_0	Prolargin	43809	52.5±0.7	17±0.8%
Q12889_CHAIN_0	Oviductin (mucin-9)	75372	47.8±1.3	13.3±1.2%
Q01995_CHAIN_0	Transgelin	22610	49.5±2.48	26±2.44%
P02765	Orosomucoïd	23511	45±2.44	20.8±1.8%
P02787_CHAIN_0	Siderophilin	77049	38.1±2.2	12±4.8%
P01009_ISOFORM_2	Alpha 1 antiprotease	39066	29.8±1.6	21±3.2%
P08727	Cytokeratin 19	44635	29.3±1.75	10±1.6%
P30086_CHAIN_0	Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein	21056	28.1±0.9	23±2%
P31949	Protein S100 A11	11740	22.6±0.25	24.5±0.5%
P02790_CHAIN_0	Hemopexin	51676	21.0±0.4	6.5±1.2%
P07737_CHAIN_0	Profilin -1	15054	18.3±0.9	15.4±4.7%

Tableau 4: liste des biomarqueurs retrouvées dans les analyses bottom up des biopsies du cancer de l’ovaire

Tous ces éléments permettent de donner une vision globale des différentes stratégies utilisables pour le criblage de l’ensemble des biomarqueurs du cancer de l’ovaire et des stratégies associées pour l’identification de ceux-ci. Les biomarqueurs trouvés à la suite de ces travaux mettent en évidence une partie des phénomènes moléculaires associés à la progression de la maladie.

Tous ces résultats sont présentés dans l’article 4.

Parmi ces acteurs moléculaires, certains pourraient être assez pertinents pour une utilisation en clinique à des fins diagnostiques. L’évaluation de l’importance d’un biomarqueur se fait par la validation de la présence de celui ci dans un grand nombre de tissus. Celle-ci nécessite d’utiliser de préférence des biopsies présentant un stade précoce de la maladie, afin de pouvoir envisager le marqueur d’intérêt pour un diagnostic de la maladie aux prémices de son développement. Il serait alors utile d’utiliser différentes

méthodes d'histologie pour la révélation de la présence du biomarqueur dans un contexte anatomique. C'est l'objectif de la partie suivante présentée dans ce manuscrit.

3.2.3. Analyse ciblée de biomarqueurs du cancer de l’ovaire : exemple d’antigen retrieval pour la détection du fragment C-terminal de Reg-alpha

Objectif :

Le but des travaux suivants est de valider la présence du fragment C-terminal de PA28 dans une large cohorte de biopsies de cancer de l’ovaire. L’idée fût de combiner les approches classiques d’immunohistochimie utilisées dans les laboratoires d’anatomo pathologie, aux développements récemment apportés par les méthodes d’extraction des protéines sur coupes de tissu, pour des analyses en spectrométrie de masse.

Les expériences d’imagerie MALDI, associées à l’utilisation des calculs statistiques par PCA nous ont permis de trouver un marqueur auparavant décrit dans les études de Rémi Lemaire au sein du laboratoire (141), à savoir le fragment C-terminal de RegAlpha, donnant un pic correspondant à un ratio m/z de 9744. Ce marqueur est d’une importance majeure quant au type de mécanisme biologique associé au cancer de l’ovaire qu’il révèle. PA28 est la sous unité 11S qui va s’associer au protéasome 20S pour former l’immunoprotéasome. Cette forme va alors pouvoir cliver des protéines endogènes à un turn over plus important et permettre une présentation de ceux-ci au CMH de classe I. L’immunoprotéasome est formé lors d’infections bactériennes ou virales ou lors de stress de différents types. Nous avons décidé de nous concentrer sur la validation de ce biomarqueur pour une application en diagnostic clinique. Par la même occasion, nous avons utilisé nos derniers développements pour son extraction sur coupe de tissu afin de permettre de valider la faisabilité de la méthode pour une éventuelle application dans des laboratoires d’anatomopathologie.

Ce marqueur a tout d’abord été validé en laboratoire d’anatomopathologie. Dans la **figure 47** sont présentés les résultats d’immunohistochimie avec l’utilisation d’un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de Reg Alpha.

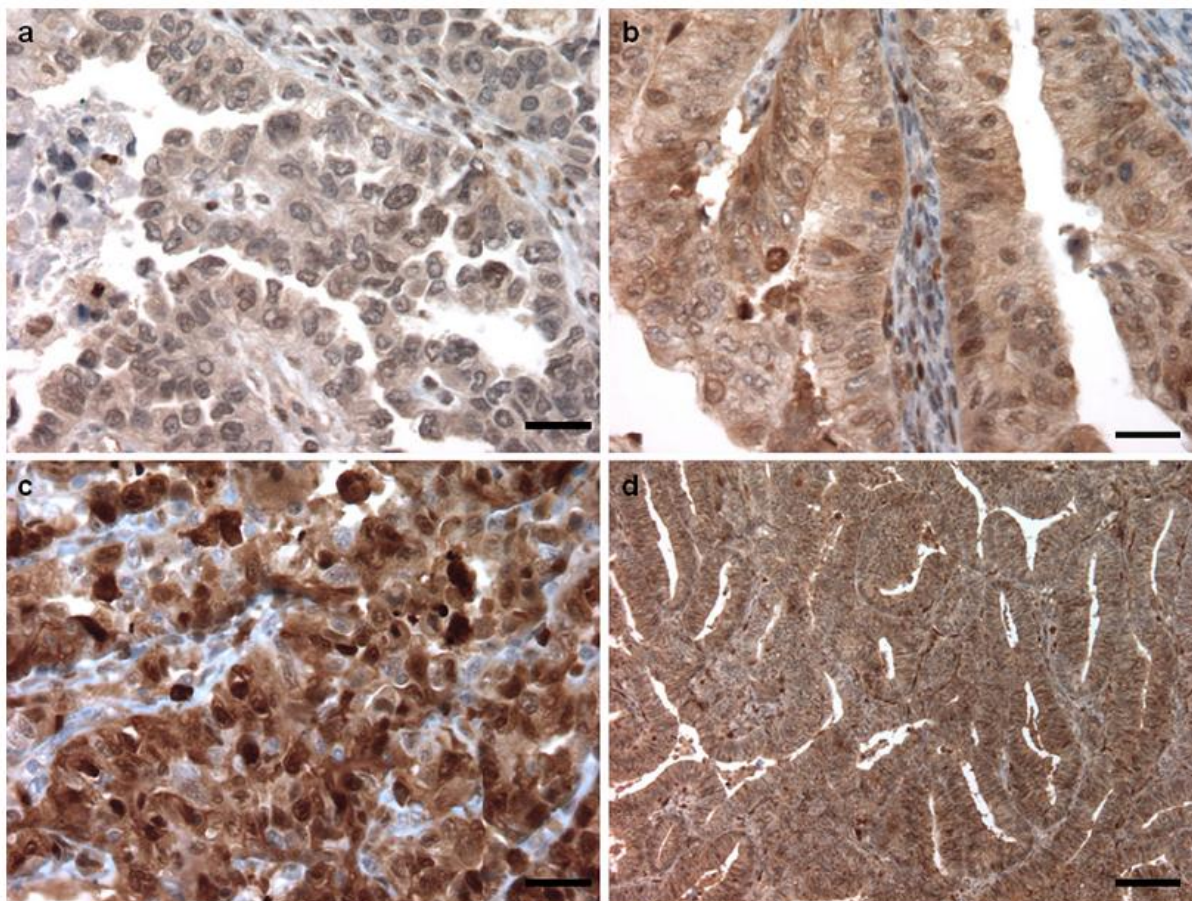


Figure 47: Validation de Cter-Reg Alpha par immunohistochimie sur différents types de cancer de l’ovaire. Les résultats de microscopie montraient une localisation cytoplasmique du fragment C-terminale de RegAlpha dans les tissus sains et cytoplasmique dans les tissus épithéliaux cancéreux.

Un point important de la pertinence d’un marqueur est basé sur sa présence à des stades précoces de la maladie. La recherche de ce biomarqueur a donc été effectuée sur des stades très précoces de la maladie, à savoir les stades I et dans certains cas les stades borderline de la pathologie.

La procédure d’extraction au HFIP s’est avérée très utile dans cette investigation. Dans un tissu de stade I de cancer de l’ovaire épithélial, la région correspondant à l’épithélium cancéreux est très localisée et le mélange classique de solvants utilisé pour la solubilisation de l’acide sinapinique, le mélange ACN/TFA0.1% 7:3 ne permet pas une extraction assez efficace de ce marqueur. Ce problème est mis en évidence dans la **figure 48**.

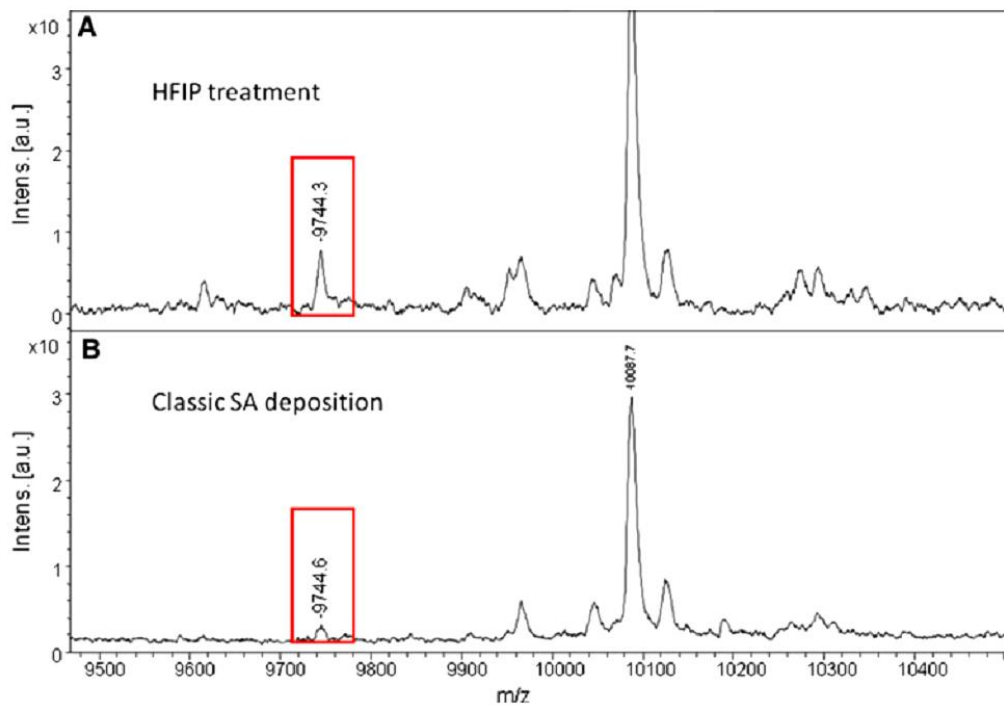


Figure 48: Comparaison des signaux obtenus pour le m/z 9744 avec le traitement HFIP (a), et un dépôt classique de matrice (b).

Ces résultats démontrent clairement que la découverte du fragment C-terminal de Reg alpha est complètement dépendante de la nature de l'approche utilisée pour le traitement de la coupe. Avec un dépôt classique de matrice, il est difficile de distinguer le pic correspondant au fragment de Reg alpha du bruit de fond de présent. Avec l'extraction au HFIP, un pic à un m/z de 9744 était clairement distinguable.

Ce traitement a donc été appliqué sur un tissu de cancer de l'ovaire épithélial séreux, au niveau de l'épithélium cancéreux, ainsi qu'au niveau du mésothélium proche de cet épithélium, afin de prouver que ce marqueur était bien spécifique de l'épithélium cancéreux.

Ces résultats sont présentés dans la **figure 49**.

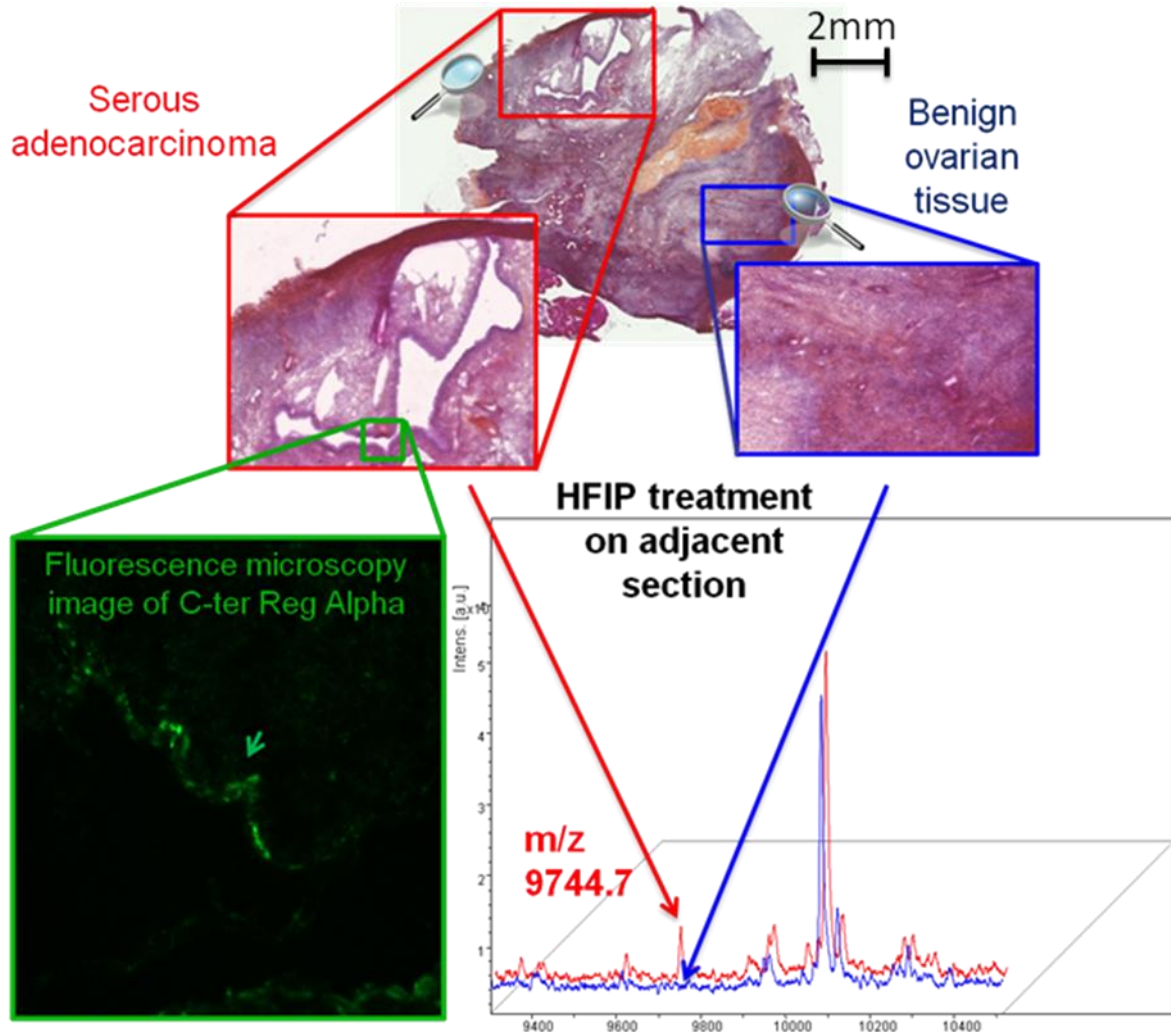


Figure 49: Profilage de Cter Reg Alpha dans la zone cancéreuse d'une biopsie de cancer de l'ovaire de stade 1 de type séreux, validation par immunofluorescence.

La zone cancéreuse extraite dans ce tissu mesure environ 12mm^2 . Les signaux obtenus pour le ratio m/z 9744 sont comparés entre les tissus cancéreux et sains. Ce signal était complètement absent de la partie saine du tissu. Ce résultat a pu être validé par immunofluorescence. Un signal était trouvé spécifiquement dans l'épithélium constituant le cancer de l'ovaire séreux. Cette approche a pu être répétée sur d'autres tissus de stade I dont les résultats sont illustrés dans les figures 50 et 51.

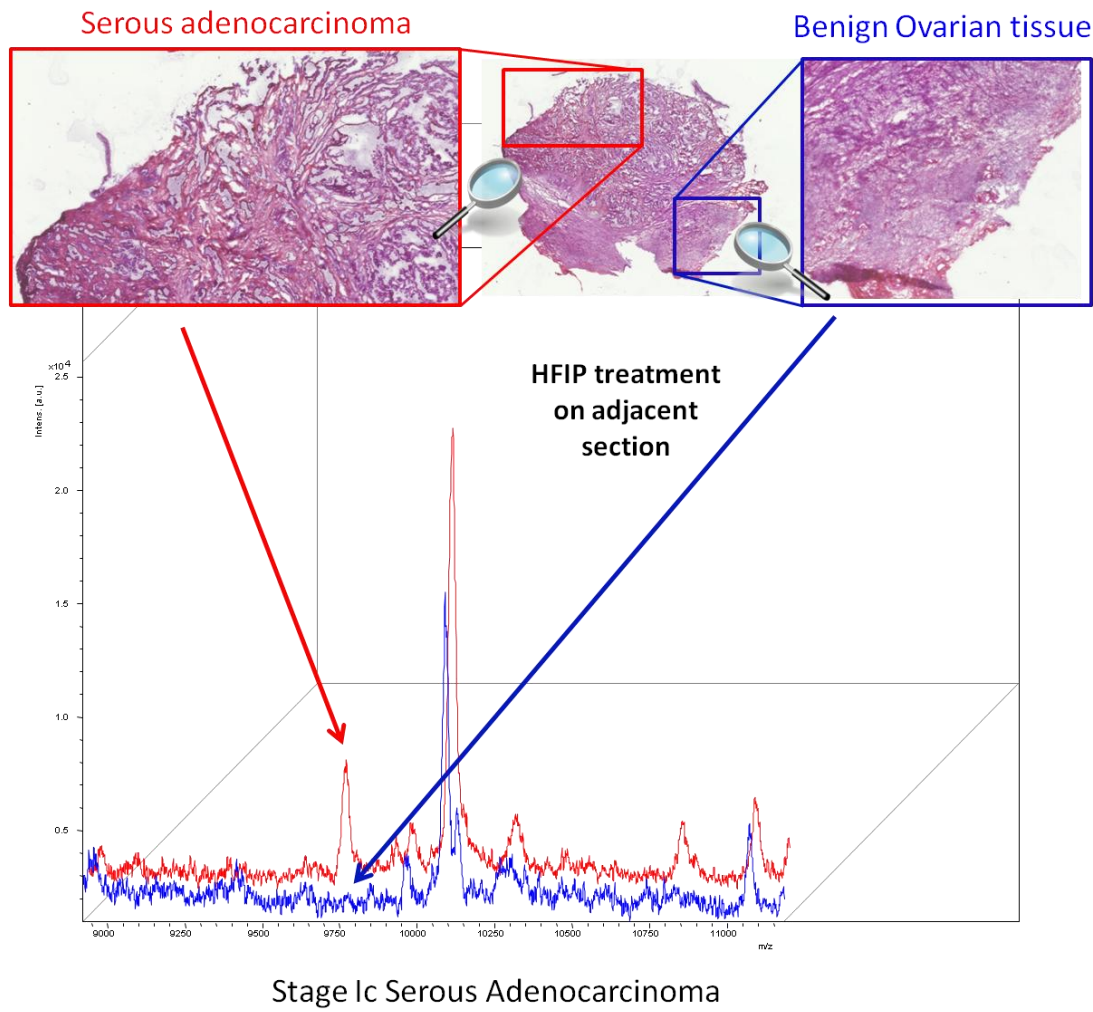


Figure 50: Profilage de Cter Reg Alpha dans la partie cancéreuse d'un tissu de cancer de l'ovaire de type séreux de stade 1.

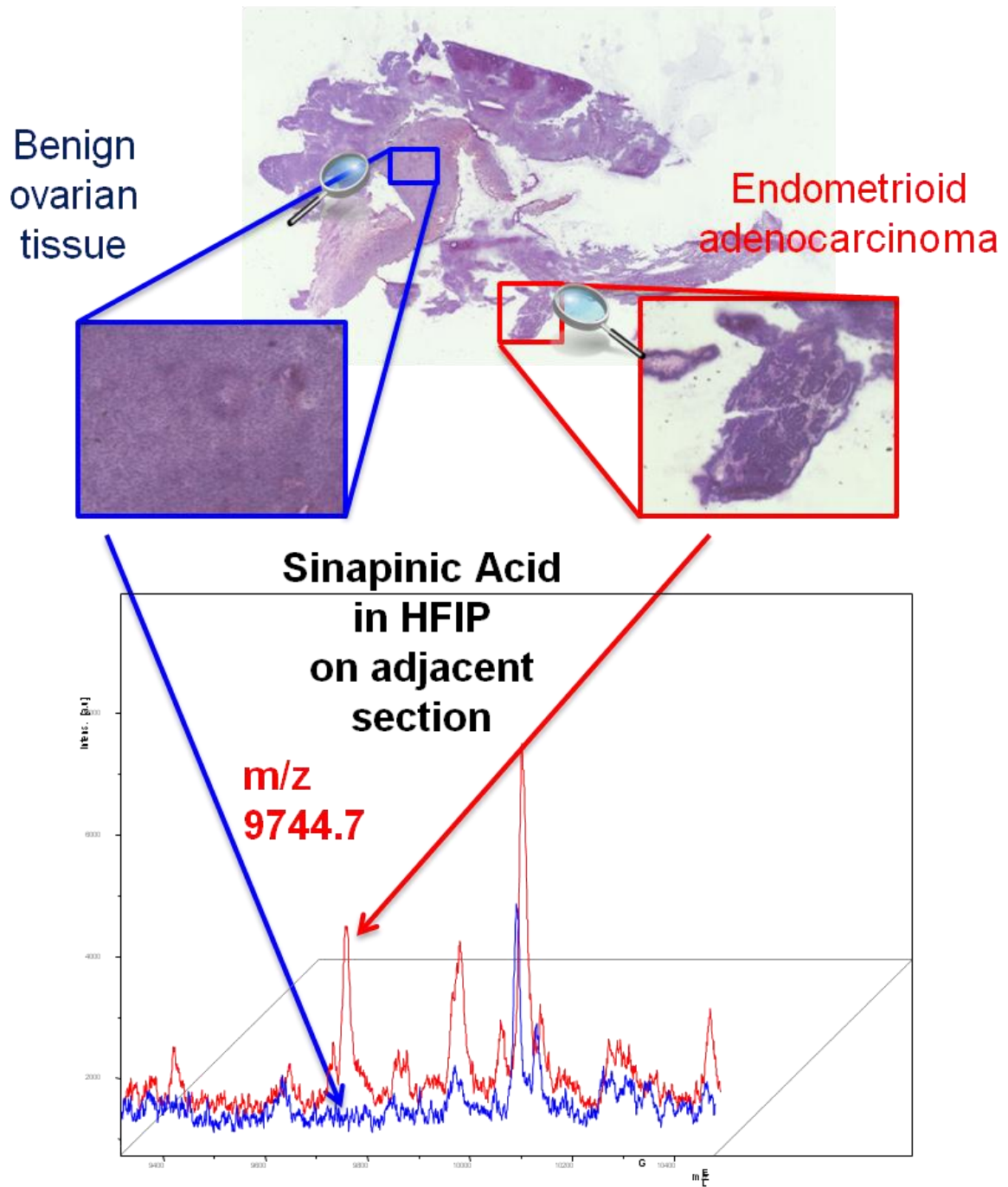


Figure 51: Profilage de Reg Alpha dans un tissu de type endométrioïde de stade 1.

Le fragment Cterminal de Reg alpha est donc retrouvé dans 100% des tissus de stades I disponibles, pour différents types de cancer épithéliaux. Cette découverte est un élément majeur de la validité de ce marqueur pour un éventuel diagnostic précoce la maladie. De plus, ce marqueur est retrouvé dans les différents types de cancers de l’ovaire épithéliaux. Le phénomène d’immuno suppression existe donc dans des différents types de cancers et le marqueur pourrait alors être utilisé pour le diagnostic du cancer de l’ovaire, sans distinction de type.

La méthode a pu être utilisée également sur d’autres types de tissus de stades plus ou moins élevés. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la **figure 52**.

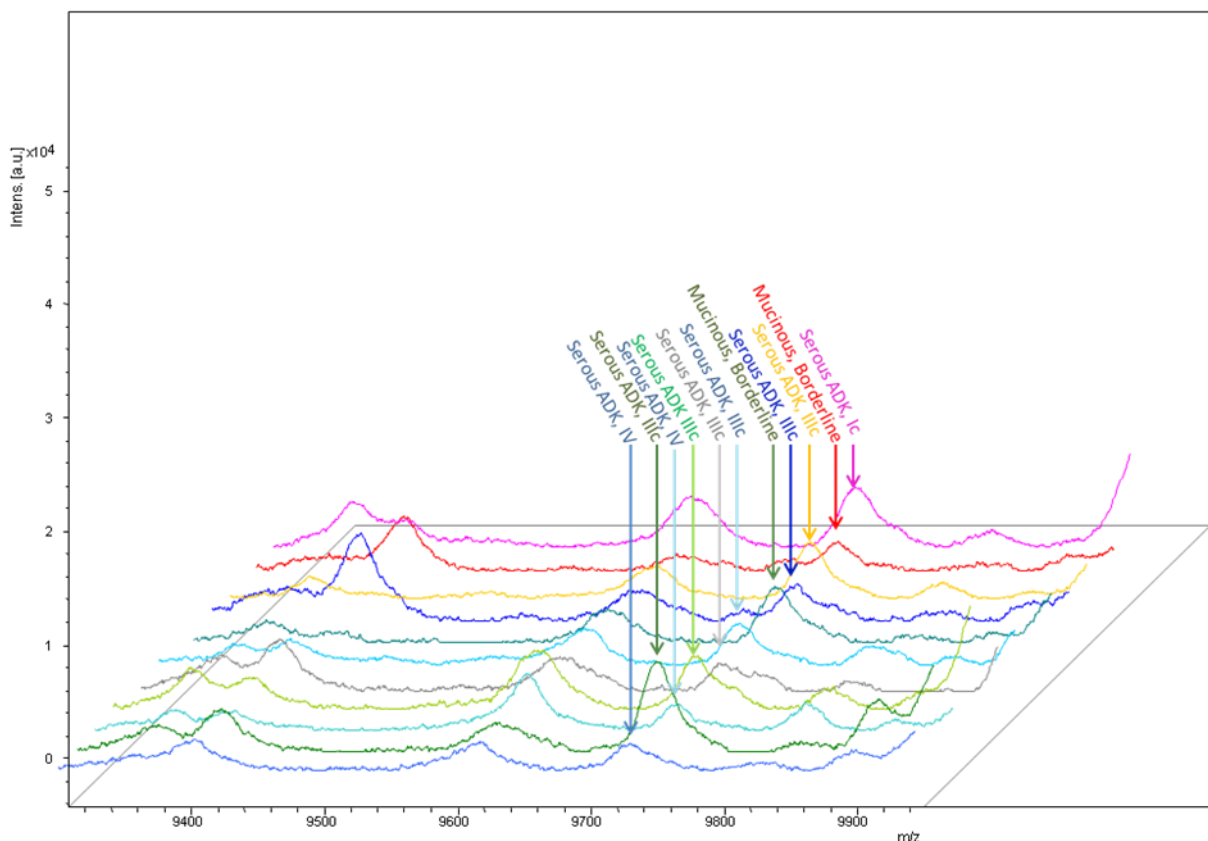


Figure 52: Validation de la présence du fragment Cter de Reg Alpha dans divers types de tissus, à différents stades de la pathologie

La méthode peut donc être appliquée à haut débit pour le criblage rapide de ce marqueur sur une large cohorte de tissus, et son utilisation, simple et efficace, pourrait être envisagée pour une utilisation en diagnostic, pour des laboratoires d’anatomo pathologie en contact avec des plateformes proposant un service d’analyses MALDI sur coupes de tissus.

Parmi les tissus sélectionnés, certains provenaient de patientes ayant préalablement subi une chimiothérapie. D'après l'information obtenue, ces patientes avaient subi une récurrence du cancer. Dans les tissus de ces patientes, le fragment C-ter de Reg alpha était retrouvé. Cet élément prouve que ce marqueur peut être utilisé pour le suivi de la récurrence du cancer de l'ovaire.

Dans la **figure 53** est présenté le signal de m/z 9744 obtenu pour un tissu de type mucineux de borderline. Ce statut histologique constitue une étape précoce au phénomène de cancérisation. Comme précédemment, un signal est spécifiquement trouvé dans la région pathologique du tissu.

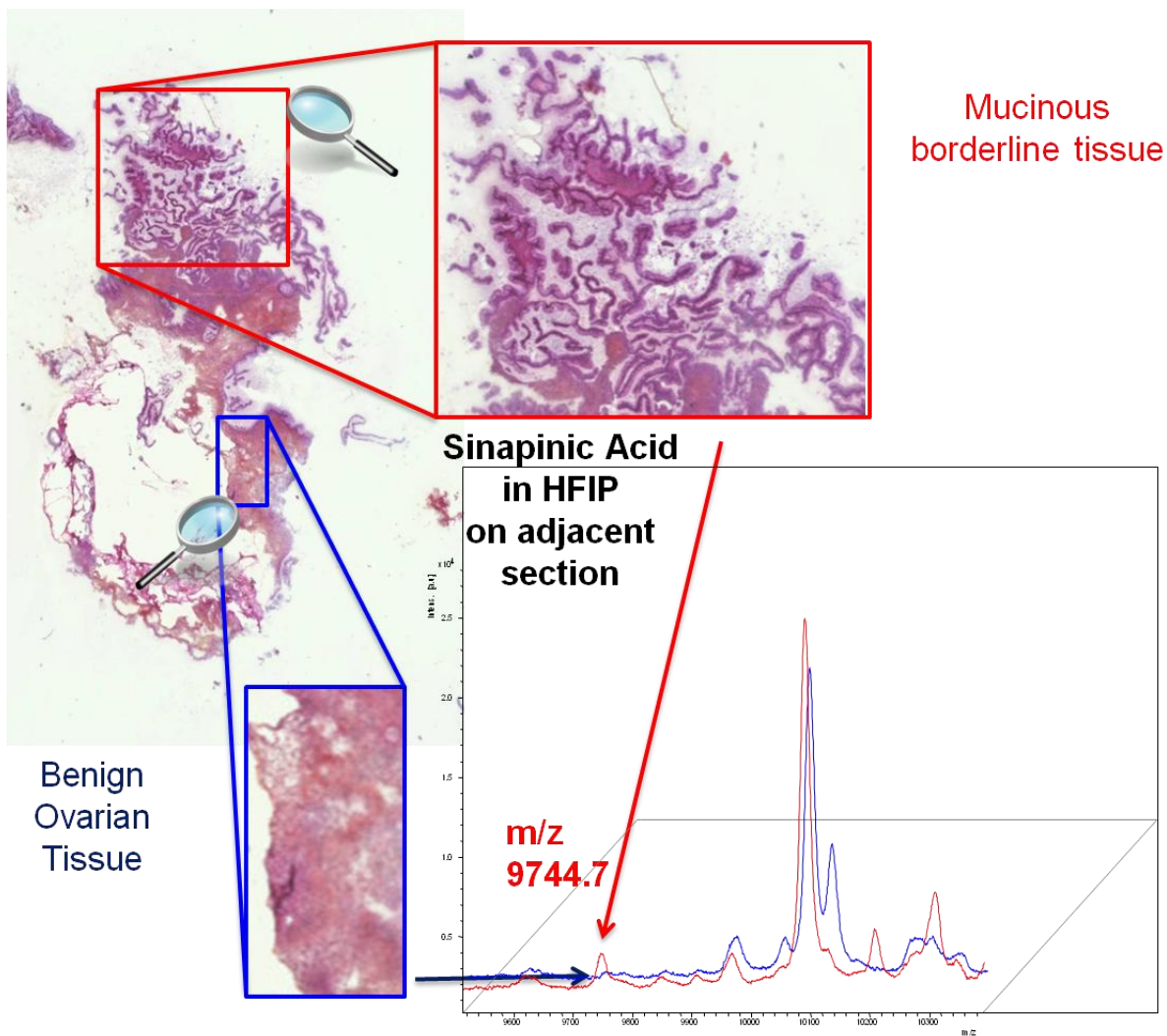


Figure 53: Profilage de Cter Reg Alpha dans un tissu borderline de type mucineux.

La présence du fragment C-ter de reg Alpha dans des tissus borderline a également été validée par immunohistochimie, comme illustré dans la **figure 54**.

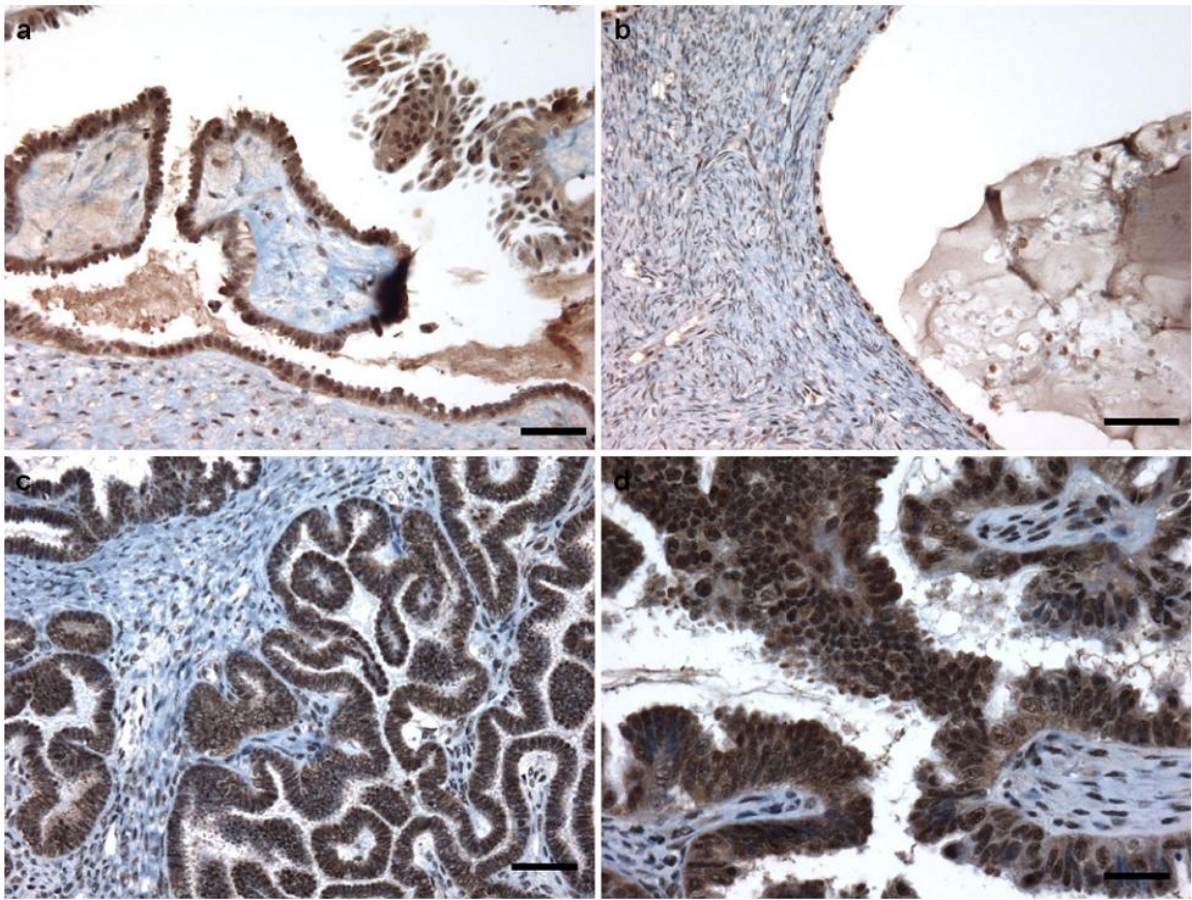


Figure 54: Validation de RegAlpha dans des tissus borderline par immunohistochimie

Ce marqueur pourrait donc permettre la détection de la pathologie avant les premiers stades de cancérisation.

L'utilisation de traitements spécifiques pour l'analyse moléculaire directe sur tissu est recommandée. Cette méthode permet de « dévoiler » des éléments moléculaires qui seraient masqués dans un contexte chimique classique. Il serait alors légitime d'apparenter la méthode aux techniques d'« antigen retrieval » utilisées en immunohistochimie. Ces approches permettent, de façon adaptée, de rendre accessibles les antigènes reconnus par des anticorps utilisés en laboratoire d'anatomo-pathologie. De manière générale, l'utilisation d'un anticorps est associée à l'utilisation d'un protocole d'antigen retrieval donné.

L'utilisation du solvant HFIP comme solvant de dissolution de l'acide sinapinique nous a ici permis de créer une approche rapide et efficace de détection de ce marqueur dans des tissus cancéreux de stade très précoces. Ce test requiert environ 20 minutes de préparation des tissus contre au moins 2 heures pour une technique classique d'immunohistochimie.

La combinaison de cette approche avec des techniques classiques d'immunohistochimie, nous a permis de valider la prévalence de biomarqueur à une valeur de 88% pour des récurrences de la pathologie, de 80.5% dans stades I est de 81.25% dans les tissus de stade III à IV.

En conclusion, nous avons prouvé dans cette partie que le fragment C-terminal de Reg Alpha était un marqueur envisageable pour le diagnostic dans un contexte anatomique. De plus, nous avons prouvé la viabilité de notre méthode d'extraction de protéines sur coupe pour une application en pathologie. Une prochaine étape de validation de la présence de ce marqueur dans des fluides biologiques tel que l'ascite, le sang ou l'urine doit désormais être envisagée pour valider la pertinence du marqueur pour une utilisation dans de larges programmes de dépistage.

3.2.4. Perspectives

En perspective générale de cette première partie sur l'utilisation des différents outils pour la recherche biomarqueurs du cancer de l'ovaire, on peut imaginer une méthode de travail en haut débit de l'utilisation de l'imagerie MALDI pour la validation de biomarqueurs. Dans un premier temps, il serait possible d'utiliser l'imagerie MALDI pour effectuer la PCA-SDA afin de discriminer les pics spécifiques de la zone cancéreuse du tissu. Une fois une liste de masses obtenue, il serait alors possible d'extraire les composés du tissu via la technologie LESA (Liquid Extraction Surface Analysis) (251). Cette méthode permet de mettre une surface solide au contact d'une goutte de solvant dans laquelle les composés de cette surface seront extraits. La solution peut alors être utilisée pour différents types de couplages afin de permettre une identification aisée de ces marqueurs. L'utilisation de cette stratégie permettra de palier aux problèmes de sensibilité rencontrés lors de l'identification de composés d'intérêt directement sur coupe. Sur la base de l'approche adoptée par l'équipe du Pr. Axel Walsh, il serait ensuite possible d'effectuer une validation des marqueurs sur une large cohorte de patientes via l'utilisation d'outils statistiques. Enfin, les biomarqueurs trouvés dans un contexte anatomique pourraient alors être testés pour leur présence dans les fluides biologiques comme le sang, validant ainsi leur pertinence pour d'éventuels tests de dosage biologiques à des fins de dépistage. Cette approche générale est résumée dans la **figure 55**.

L'utilisation de cette méthodologie permettrait l'aboutissement de nombreuses études à large échelle à la découverte d'une liste de biomarqueurs statistiquement validés. L'utilisation consortiale de cette stratégie permettrait à différents laboratoires de confronter leurs données et de valider celles-ci à l'échelle internationale.

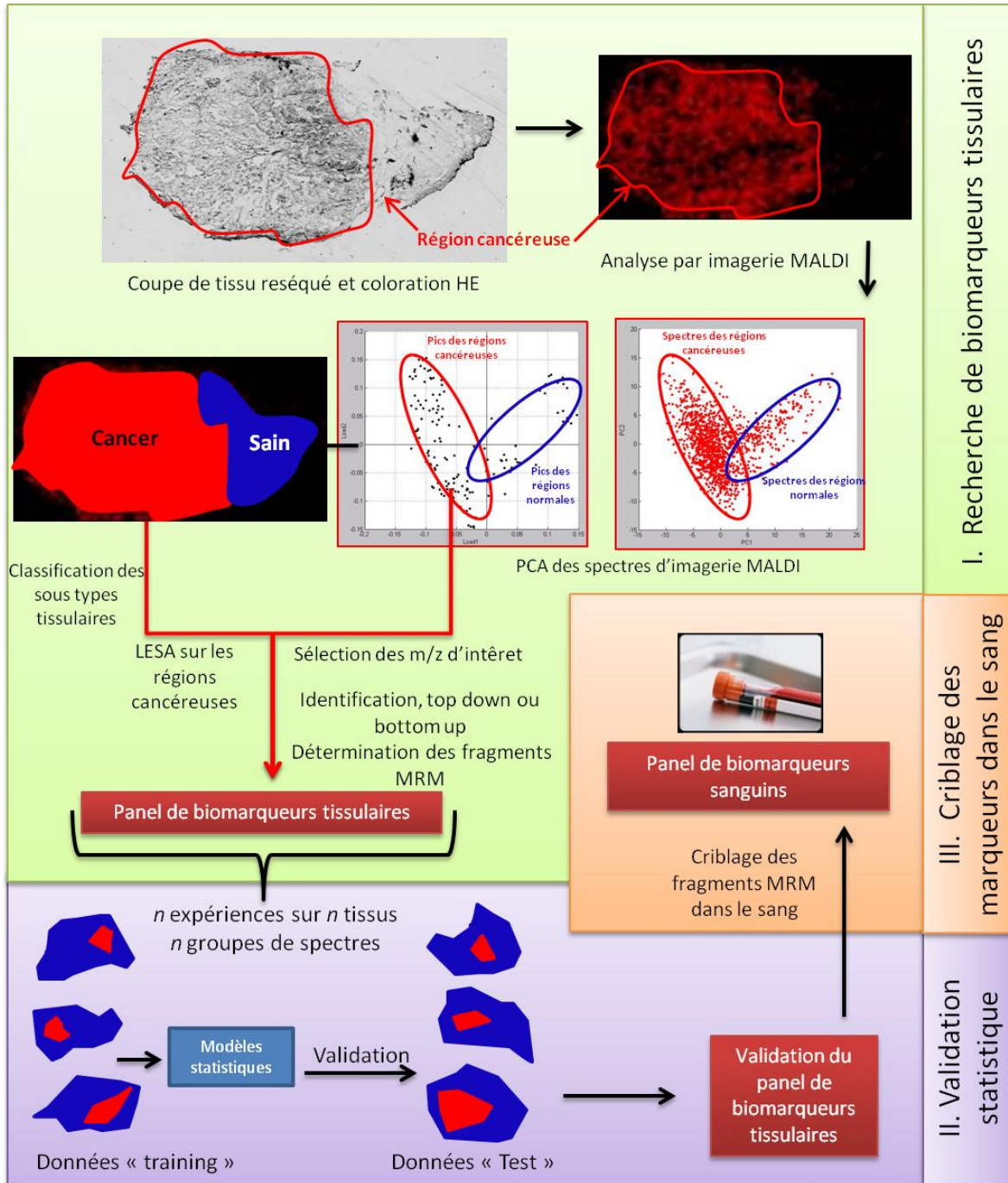


Figure 55 : Perspectives pour la recherche de biomarqueurs du cancer de l’ovaire.

A ce stade du manuscrit, nous avons pu voir que le développement de méthodes de préparation chimique des coupes de tissus, en parallèle à des calculs pour l'analyse de l'information spectrale, permettait de répondre à des questionnements sur la méthodologie de recherche de biomarqueurs et la validation spécifique de certains d'entre eux.

Les analyses d'imagerie et de profiling MALDI ouvrent donc beaucoup d'opportunités pour divers types d'investigation. L'analyse sur coupes de tissus peut donc être un outil attrayant pour procurer des éléments de réponse à de nouvelles problématiques cliniques.

La suite du projet consiste à l'utilisation des analyses sur coupe de tissu pour un autre type de questionnement, ayant un impact très important dans le domaine de la clinique gynécologique : la détermination de l'origine anatomique du cancer de l'ovaire.

3.2.5. Détermination de l'origine du cancer sur la base de profils moléculaires

Objectif :

Une des problématiques majeures du cancer de l'ovaire dans le domaine clinique est l'origine de la pathologie. Aujourd'hui, les pathologistes ne sont pas en mesure de déterminer si l'apparition d'épithélium cancéreux au sein de l'ovaire est un processus « de novo », provenant de l'épithélium de surface de l'ovaire ou si le cancer de l'ovaire aurait une origine cellulaire ectopique, provenant d'autres tissus du tractus génital. Cette distinction présenterait un intérêt majeur pour la prise en charge des patientes, décrit plus bas. Depuis quelques années, différentes équipes cherchent à valider cette deuxième théorie, qui apparaît dès lors de plus en plus plausible. La validation de celle-ci aurait un impact clinique extrêmement important pour le cas des cancers séreux. Il serait possible pour le chirurgien d'orienter ces décisions afin de préserver l'ovaire des patientes qui subissent des salpingo-oophorectomies prophylactiques. Le but de cette partie est d'utiliser les outils analytiques à disposition afin de donner des éléments de réponse à la question de l'origine mullérienne du cancer de l'ovaire. Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'article 6.

3.2.4.1. L'origine du cancer de l'ovaire, une problématique à haut impact clinique

Il existe plusieurs types histologiquement reconnus de cancers de l'ovaire épithéliaux (6). Le type majoritaire est le type séreux qui représente 60% des cas cliniques. Le type endométrioïde représente 10 à 20% des tumeurs. Enfin des types histologiques minoritaires existent tels que le cancer épithélial à cellules claires (moins de 10%), mucineux (moins de 5%) et moins de 1% de type indifférencié(11). Il existe aussi plusieurs modèles de carcinogenèse (11). Le type I regroupe les cancers séreux de bas grade, les types mucineux, endométrioïde de bas grade et le type à cellules claires. Ce type forme des précurseurs génétiquement stables de type bénin ou borderline avec un continuum de progression tumorale. Ils se manifestent par la formation de tumeurs annexielles de grandes dimensions souvent limitées à l'ovaire, ont une progression lente et un bon pronostic. Le type II représente 75% des cancers de l'ovaire et comporte les cancers séreux de haut grade, mixte, les carcinosarcomes et les types indifférenciés. Ils ont souvent une instabilité chromosomique et sont généralement cliniquement agressifs. Enfin il existe plusieurs stades de progression de

la maladie (252). Il est généralement accepté par les cliniciens qu'il existe une progression clinique d'une lésion borderline vers l'état d'adénocarcinome pour certains types de cancers tel que le type endométrioïde.

Cependant plusieurs théories s'opposent pour expliquer la carcinogénèse ovarienne. Une théorie ancienne est celle d'une apparition *de novo* du cancer. Cependant, le col, l'endomètre et les trompes ont pour origine embryologique les canaux de Müller alors que les ovaires dérivent de l'épithélium mésodermique du sinus urogénital. Cette théorie semble aujourd'hui remise en cause. Elle aurait été initialement acceptée du fait de l'absence de preuve fiable d'une autre origine(6). Selon une autre théorie, la plasticité de l'épithélium mésothélial ovarien de surface permettrait sa métaplasie en épithélium müllérien. Enfin, il a plus récemment été proposé la théorie selon laquelle les tumeurs de phénotype müllérien (séreux, endométrioïde et à cellules claires) dériveraient d'un tissu müllérien et non du mésothélium ovarien. Plusieurs études viennent soutenir cette hypothèse. Dans le cas du cancer séreux, la plus fréquente des néoplasies ovariennes, il a été montré que dans 80% des cas, le cancer ovarien est associé à des lésions cancéreuses *in situ* de l'épithélium tubaire appelées STIC (Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma). Ces dernières pourraient être à l'origine du cancer ovarien, d'autant plus que des mutations de p53 communes aux cancers et aux STIC ont été mises en évidence chez certaines patientes (6). Cette théorie est illustrée dans la **figure 56**.

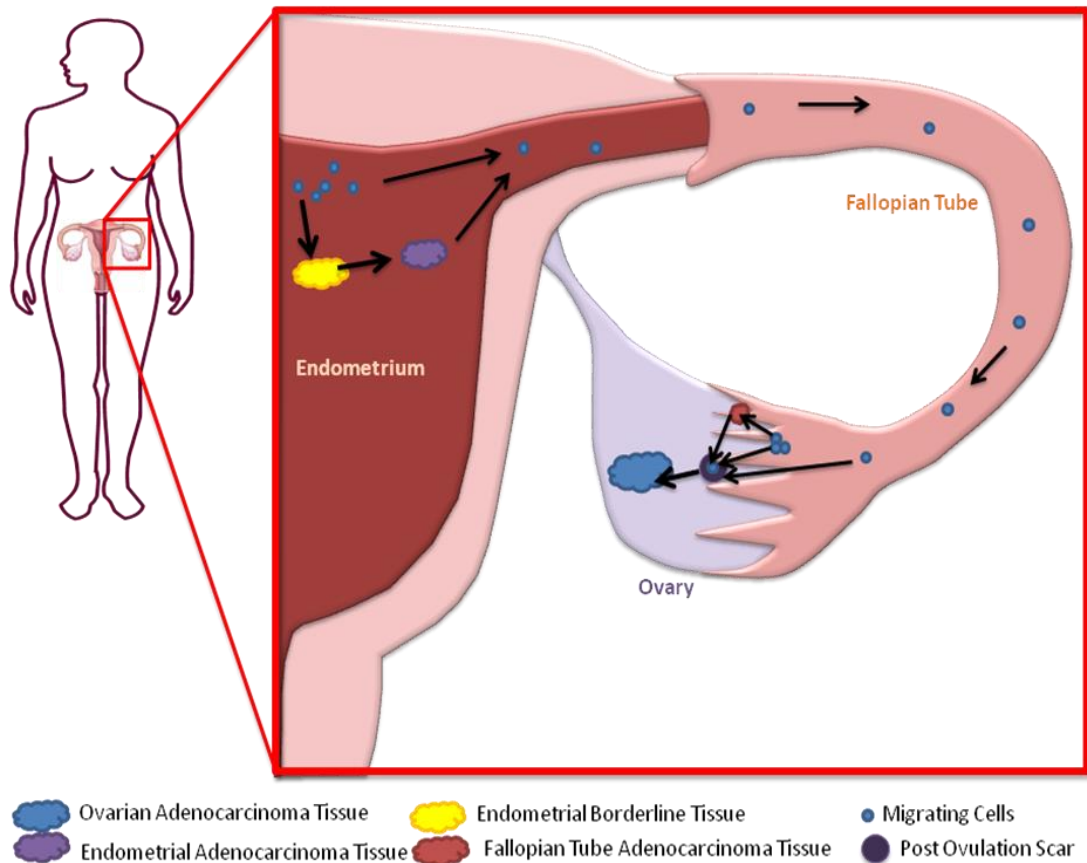


Figure 56: Schématisation de la théorie de l'origine ectopique des cancers de l'ovaire épithéliaux

La validation de cette dernière théorie permettrait à terme d'améliorer la qualité de vie d'un grand nombre de patientes présentant un risque de développer un cancer de l'ovaire. En effet, le cancer de l'ovaire épithélial le plus prévalent est le type séreux représentant, comme mentionné précédemment, 60% des cas. Les patientes présentant une mutation du gène BRCA1 et ayant une ascendance auparavant affectée par la maladie, sont généralement prises en charge chirurgicalement de manière préventive, pour le retrait complet des annexes, composées des ovaires et des trompes. Cette opération a malheureusement pour conséquence la perte de la fertilité de la patiente, ainsi que de ces menstruations. Une patiente à risque peut donc perdre la possibilité de procréer et être ménopausée à un âge précoce. Si l'origine du cancer de l'ovaire était validée, alors il serait possible de limiter la chirurgie à la fimbriectomie, qui consiste au retrait de la frimbria *i.e* la zone anatomique qui constitue la jonction entre le pavillon de la trompe de Fallope et l'ovaire. Les patientes pourraient garder une partie de leur ovaire, rester fertile tout en gardant un cycle menstruel et ainsi conserver le même niveau de qualité de vie.

Afin d'apporter des éléments de réponse à la question de l'origine du cancer de l'ovaire, nous avons décidé d'utiliser les méthodes d'analyses moléculaires dans un contexte histologique. L'investigation a été décomposée en deux parties. La première étape de celle-ci a consisté au ciblage rapide des profils moléculaires des sous types histologiques directement sur coupe, par acquisition de spectres MALDI et analyses PCA pour avoir une visualisation sur deux dimensions de la composition globale et différentielle des tissus.

La deuxième étape a consisté à l'extraction des digestats tryptique sur tissus qui ont servi pour l'analyse MALDI afin de faire leur analyse en LC-MS/MS. Les informations de distributions relatives des protéines ont alors pu nous informer des divers mécanismes qu'il pourrait y avoir en commun entre les cancers de l'ovaire séreux et le cancer de la trompe. Ce type d'analyse nous a également permis d'accéder à l'identification de biomarqueurs hautement spécifiques des tissus sélectionnés.

3.2.4.2. Analyses directes sur coupes de régions histologiques d'intérêt associées au cancer de l'ovaire

Nous avons décidé d'utiliser des outils statistiques associés à l'application du profiling MALDI dans le but d'apporter des éléments de réponse à la problématique clinique de l'origine du cancer de l'ovaire. Pour cette investigation, nous nous sommes concentrés sur les types les plus prévalents de cancer de l'ovaire épithéliaux, les types séreux et endométrioïde. Une étape d'antigen retrieval par soumission des coupes aux microondes a été réalisée afin de modifier la conformation du réseau protéique induit par la fixation au formaldéhyde. Malgré cette étape, l'analyse de protéines natives n'est pas possible en raison de la force des liaisons existant entre les protéines. Une étape de digestion tryptique a donc été réalisée sur différentes zones des tissus pour effectuer une analyse en bottom up. 50 spectres ont été acquis pour chaque type de tissu afin de comparer des groupes de données sans que la variabilité spectrale au niveau du tissu n'entrave l'interprétation des résultats. Des analyses PCA ont alors été réalisées pour comparer ces différents groupes de spectres. Une fois l'ensemble des spectres récoltés sur ces différents sous types de tissu, il a été possible d'utiliser la PCA afin de comparer les groupes de spectres les uns avec les autres et d'en déterminer les « tendances » d'évolution moléculaire.

La première analyse a reposé sur la comparaison de tissus ovariens cancéreux et sains avec les tissus tubaires. Les résultats des calculs PCA sont présentés dans la **figure 57A**. Les résultats illustrent un profil moléculaire tubaire proche de celui obtenu pour les tissus de cancer de l'ovaire séreux. Les résultats de classification hiérarchique montrent que les spectres provenant du cancer de l'ovaire sont très différents des spectres provenant de l'ovaire sain et sont plus similaires à ceux de la trompe de Fallope. Une deuxième analyse a été faite pour un cas où il existait à la fois des lésions cancéreuses au niveau de l'ovaire et au niveau de la trompe. Les résultats sont présentés dans la **figure 57B**. Il était alors possible de déterminer que les spectres du cancer de la trompe avaient un profil intermédiaire entre la trompe saine et le cancer de l'ovaire. Cela suggère qu'il pourrait y avoir une évolution moléculaire des tissus sains de la trompe vers un état cancéreux et que le cancer de l'ovaire aurait un profil moléculaire qui est l'évolution du cancer de la trompe.

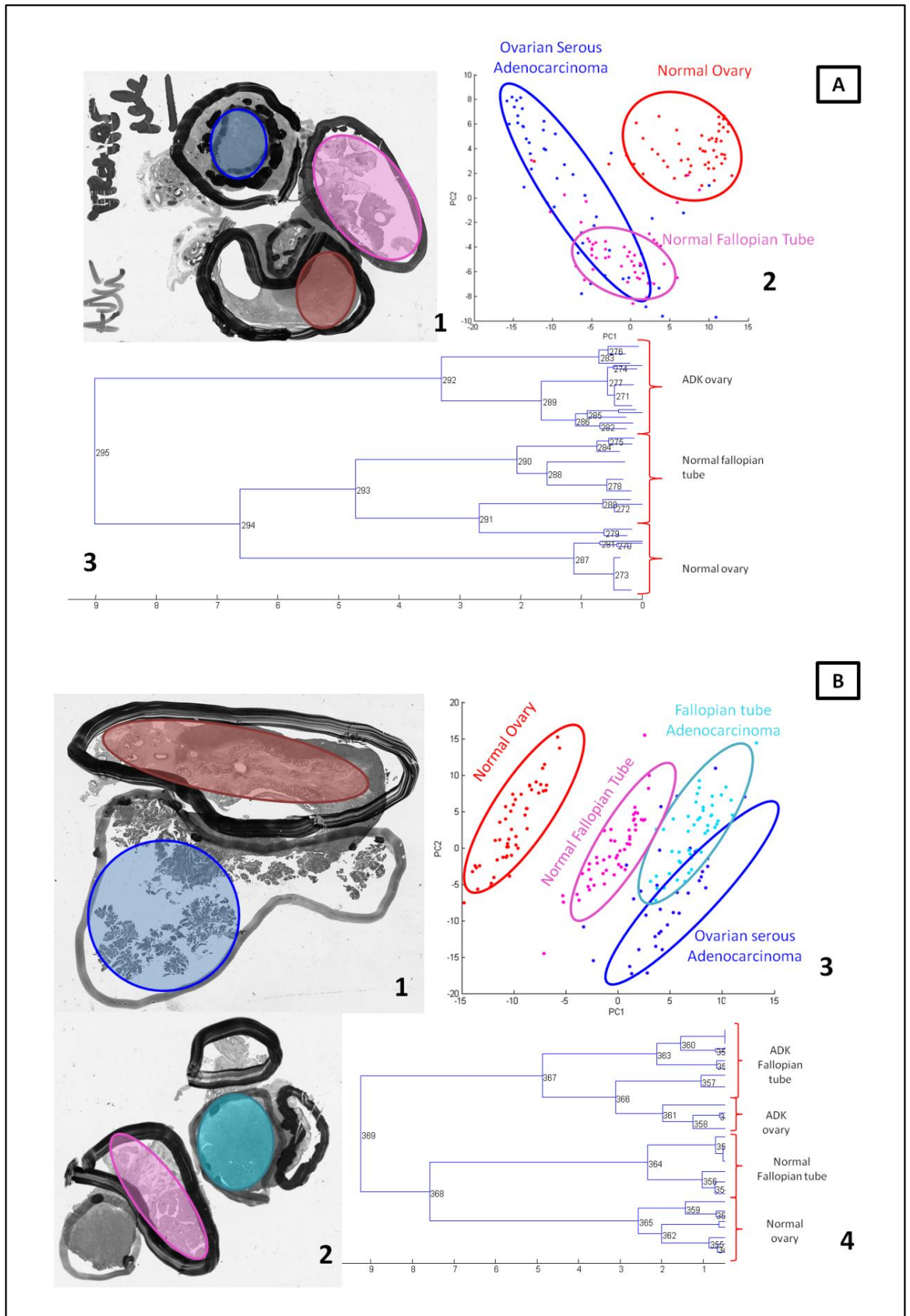


Figure 57 :Profils moléculaires de cancer de l'ovaire séreux et de trompe de Fallope

Le même type d'analyse a été effectué pour deux cas de cancers endométrioïdes présentés dans la **figure 58**. Dans le premier cas (**figure 58A**), la patiente présentait à la fois des tissus cancéreux et borderline d'endomètre et ovariens. Les profils PCA montraient un ordre de profils allant des spectres borderline à cancéreux et d'endométrieux à ovarien. Cette analyse confirme que l'état tissulaire cancéreux serait l'évolution de l'état borderline et suggère que les lésions de l'endomètre pourraient être à l'origine des lésions ovariennes.

Dans la deuxième analyse, l'endomètre de la patiente présentait une zone d'hyperplasie. Les spectres de cette zone ont été inclus dans l'analyse. Ceux-ci présentaient un profil intermédiaire entre l'endomètre sain et cancéreux. Comme pour l'analyse précédente, les profils moléculaires montraient une évolution vers le stade borderline de l'ovaire puis le stade cancéreux.

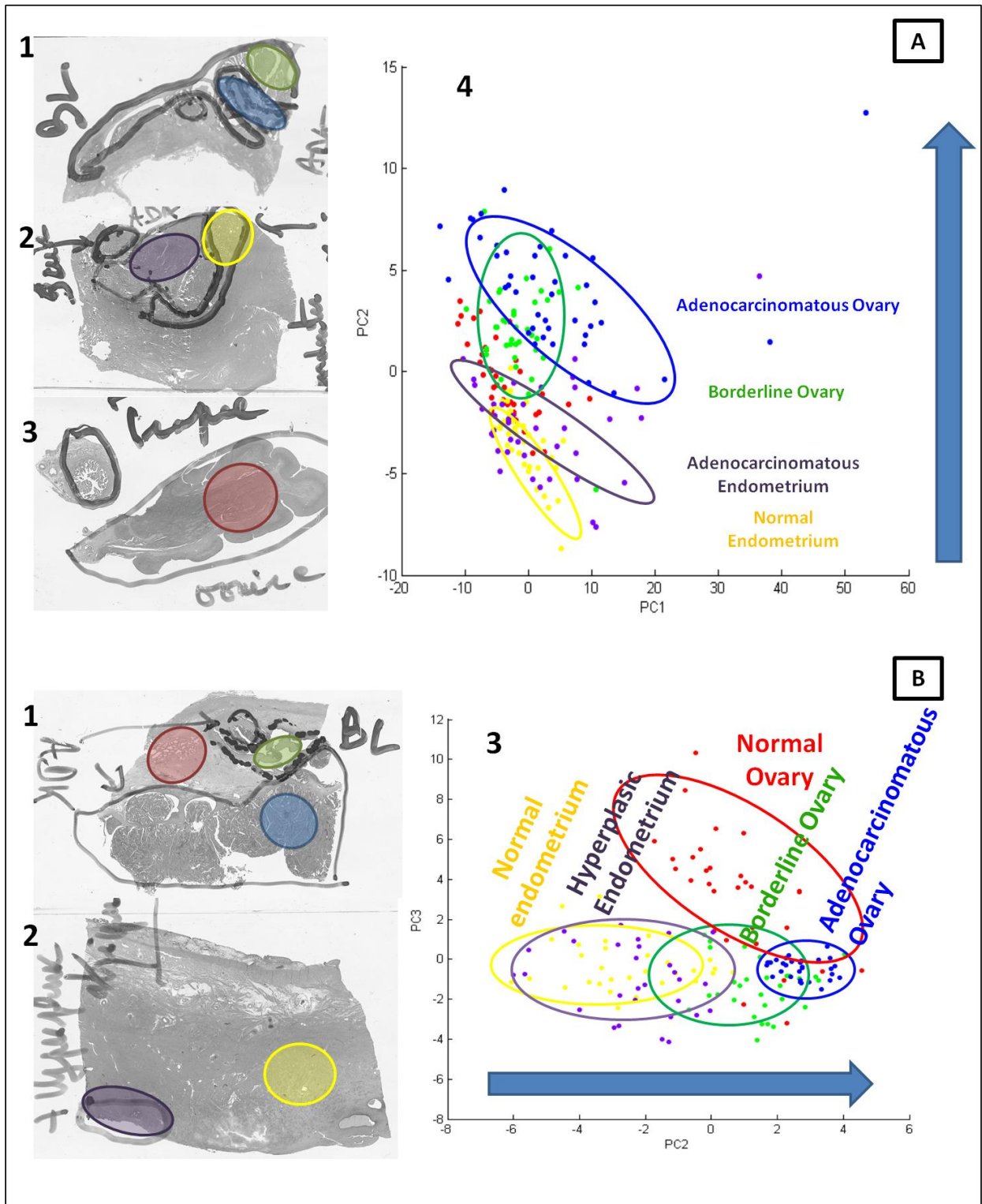


Figure 58: Figure : Analyse moléculaire de tissus de cancer de l'ovaire endométrioïde et de l'endomètre

Ces éléments viennent en support de la théorie de l'origine ectopique du cancer de l'ovaire. Cependant une étape d'identification des protéines différentielles entre les types de

tissus permettrait de cibler les acteurs moléculaires en commun entre les types de cancers et leur tissus mullériens d'origine supposée.

3.2.4.3. Analyses protéomiques des régions tissulaires d'intérêt

L'identification sur tissu étant très difficile, celle-ci a été réalisée via une autre approche. Des extractions sur les zones de tissu d'intérêt ont été réalisées grâce à des rinçages à l'acétonitrile. Une extraction des peptides en phase solide a ensuite été faite et les extraits analysés en LC-MS via l'instrumentation Orbitrap. Cette méthode a été appliquée pour les tissus associés au cancer de l'ovaire sereux présenté dans la **figure 57B**. Les différentes identifications ont alors été comparées entre les types tissulaires afin de discerner les potentielles similitudes entre les types de cancer de l'ovaire épithéliaux et les tissus mullériens qui pourraient être à leur origine.

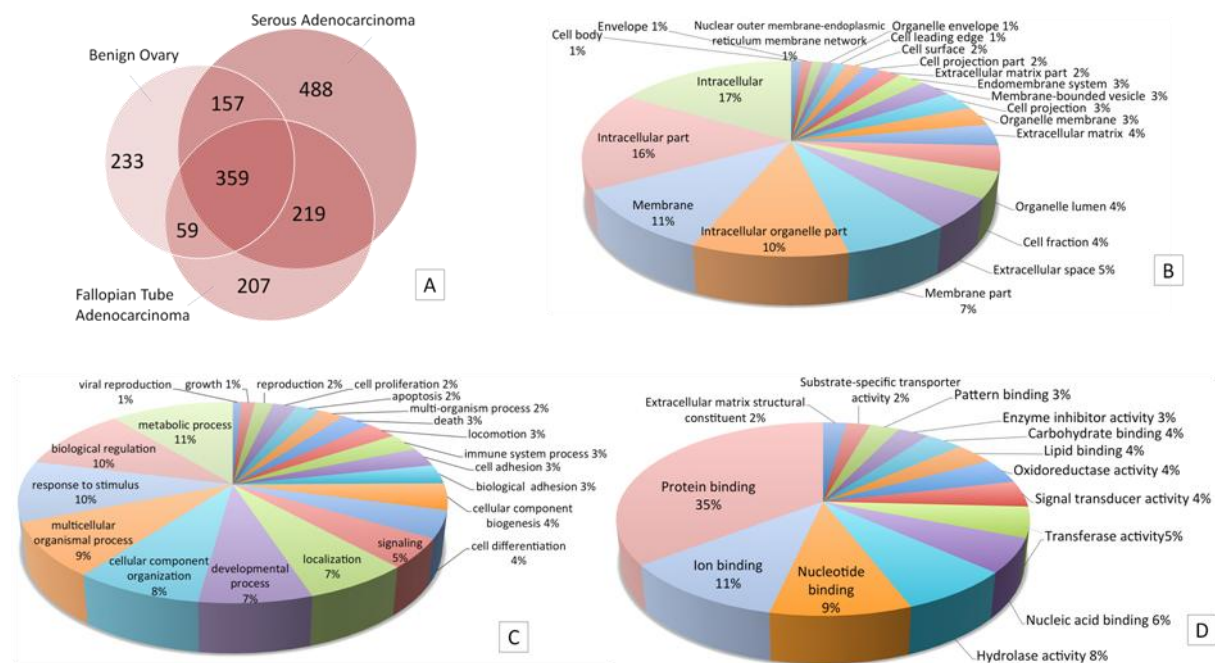


Figure 59 : Distributions relatives des processus cellulaires et des fonctions moléculaires des protéines communes identifiées entre les tissus de cancer de l'ovaire et de cancer de la trompe.

Dans la **figure 59A** est présenté le diagramme des protéines en commun entre les tissus de cancer de l'ovaire séreux, de cancer de la trompe de la même patiente et de l'ovaire sain associé. Ce diagramme montre qu'une majorité des protéines est retrouvée communément entre les tissus cancéreux de l'ovaire et de la trompe. Le nombre de ces protéines est supérieur à celui des protéines retrouvées entre l'ovaire sain et l'ovaire cancéreux. D'après cette observation, le tissu cancéreux ovarien présenterait plus de similitudes avec le profil de cancer de la trompe que le profil ovaire sain.

Dans la **figure 59C** sont représentées les processus cellulaires communs entre le cancer de l'ovaire séreux et le cancer de la trompe et dans la **figure 59D**, les fonctions moléculaires de ces protéines. La procédure d'analyse a été la suivante: sur la base des scores d'identification des protéines obtenues, celles sur- et sous- régulées dans le cancer de l'ovaire sont sélectionnées. Parmi ces protéines, ont été considérées celles dont le score est similaire entre le tissu du cancer de l'ovaire et du cancer de la trompe. Ces protéines, qui ont une expression similaire entre les tissus tubaire et ovariens, pourraient en effet être les acteurs moléculaires communs des mécanismes de cancérisation de la trompe et de l'ovaire. A partir des ces données, une recherche sur la base des numéros d'accessions des protéines d'intérêt a alors été réalisée avec le logiciel Blast2GO afin d'accéder à l'ontologie génétique des protéines obtenues. Les principales fonctions cellulaires régissant les phénomènes de cancérisation communs entre le cancer de la trompe et le cancer de l'ovaire séreux peuvent alors être obtenues et classées en fonction de leur importance. Dans la **figure 59D**, on peut alors se rendre compte que la cancérisation de la trompe et de l'ovaire sont régies par des processus impliquant la liaison moléculaire. L'activité catalytique apparaît comme un autre processus également très important. Les marqueurs retrouvés concordent avec un certain nombre de données obtenues pour le cancer de l'ovaire (143). Ces données permettent d'apporter une nouvelle preuve que les mécanismes de cancérisation des cancers de l'ovaire séreux et de la trompe pourraient être communs. Dans la **figure 60** sont illustrées les interactions qu'il existe entre les différentes fonctions moléculaires retrouvées communément entre les cancers ovariens et tubaires séreux.

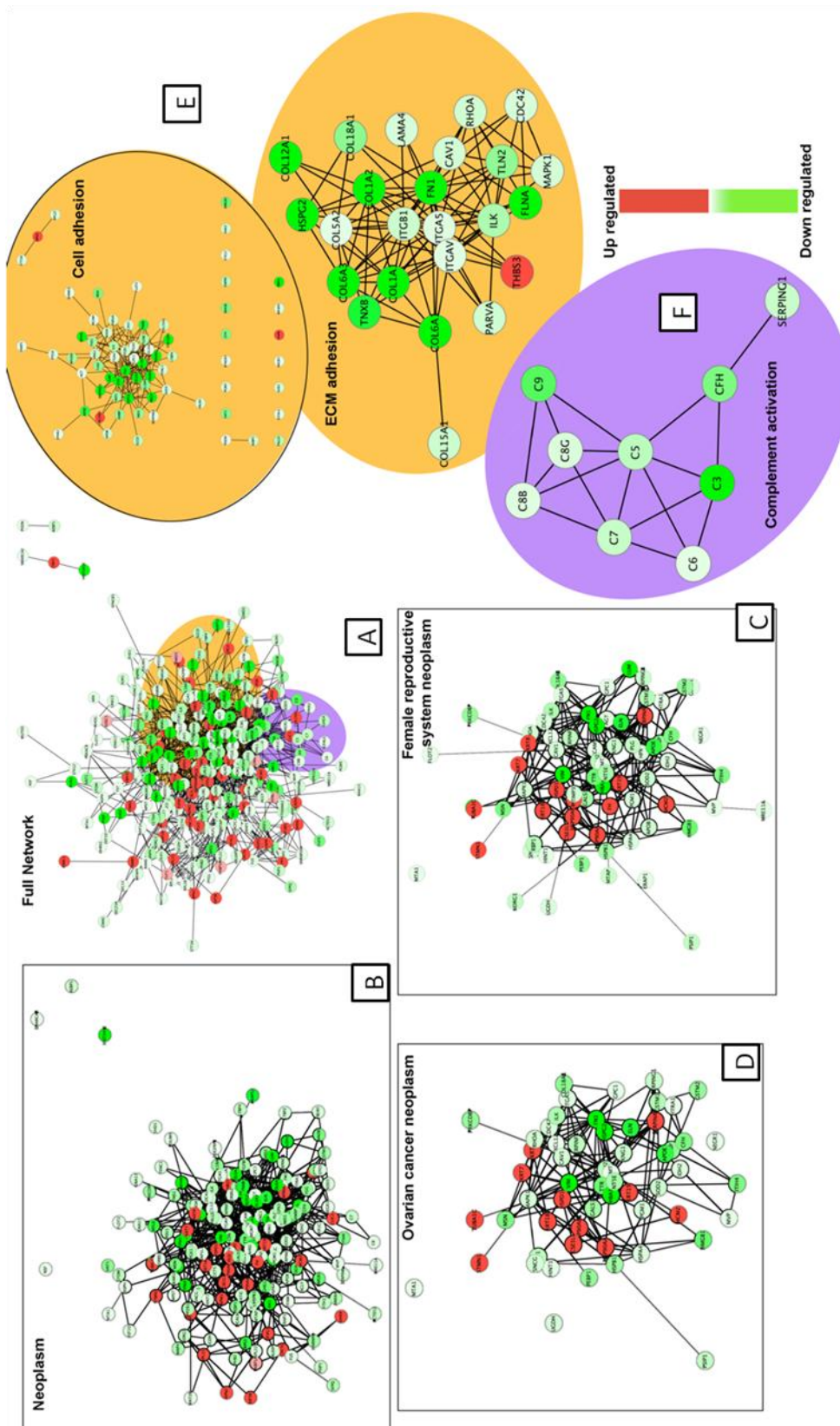


Figure 60: Réseaux d'interaction des protéines communes entre le cancer de l'ovaire séreux et le cancer de la trompe d'une même patiente.

A partir de ces informations, il est possible de remonter à la fonction moléculaire de chaque protéine d'intérêt dans l'analyse. A chaque fonction moléculaire représentée dans le diagramme, correspond un groupe de protéines. Grâce à l'utilisation du logiciel Cytoscape, il a alors été possible de tracer le réseau d'interactions existant entre les protéines de diverses fonctions. De plus, il est possible d'ajouter à cette analyse une information de quantification différentielle entre les échantillons. La sur- et sous- régulation des protéines dans les deux types de cancer représentés dans le réseau d'interactions peuvent alors être mis en évidence par un code de couleur rouge/vert. Plusieurs de ces résultats sont présentés dans la **figure 60**, dans les réseaux sont notés les noms des gènes codant pour les protéines identifiées.

Dans un premier temps, il est possible de vérifier si les accessions représentées dans le réseau correspondent à des gènes reconnus comme étant impliqués dans les pathologies néoplasiques. Cette information a pu être obtenue grâce un plugin Reactome qui permet de rechercher dans les banques de données NCI.

La **figure 60A** donne une vision globale des protéines sur et sous régulées dans ces deux types de pathologies. On observe qu'une majorité de protéines est sous régulée dans ce modèle.

Dans les **figures 60B, C et D** sont représentés les réseaux d'interactions des protéines impliquées dans diverses pathologies. Il apparaît qu'une majorité de protéines identifiées a déjà été caractérisée dans des néoplasmes (**figure 60B**). Plus spécifiquement, une majorité des protéines a déjà été caractérisée dans des néoplasmes du système reproductif féminin (**figure 60C**) et dans le cancer de l'ovaire (**figure 60D**).

Parmi les principales fonctions moléculaires représentées, on trouve l'adhésion cellulaire. Ces fonctions sont représentées dans la **figure 60E**.

On observe que la majorité de ces protéines sont sous régulées dans ce réseau. Cette observation suggère que des mécanismes de métastase pourraient être impliqués communément entre les cancers de l'ovaire de la trompe séreux. Dans ce contexte, le cancer de l'ovaire épithélial serait dû à une métastase précoce d'un autre type de tissu cancéreux mullérien.

Un autre type de mécanisme représenté est l'activation du complément. La **figure 60F** montre qu'il y a aussi une sous expression des protéines du complément. Cela correspond au mécanisme d'immunosuppression observé auparavant comme par exemple avec le clivage de l'activateur de l'immunoproteasome PA28.

Ces résultats illustrent des mécanismes déjà connus dans les processus de cancérisations épithéliales de l'ovaire. Les protéines ici présentées sont toutes des protéines communes entre le cancer de l'ovaire et le cancer de la trompe séreux. Des phénomènes communs donc existeraient entre ces deux types de néoplasies. Sans donner une conclusion définitive sur l'origine du cancer de l'ovaire, ces résultats suggèreraient une origine tubaire du cancer de l'ovaire séreux.

A partir de ces mêmes analyses de comparaison, il a été possible d'extraire la liste des protéines spécifiques des cancers de l'ovaire séreux et de la trompe. Nous avons également pu en étudier les différentes fonctions moléculaires et les processus cellulaires relatifs à ces protéines. Ces résultats sont présentés dans la **figure 61**. Les protéines retrouvées spécifiquement dans les différents cancers correspondent à celles qui permettent le développement spécifique de chaque cancer.

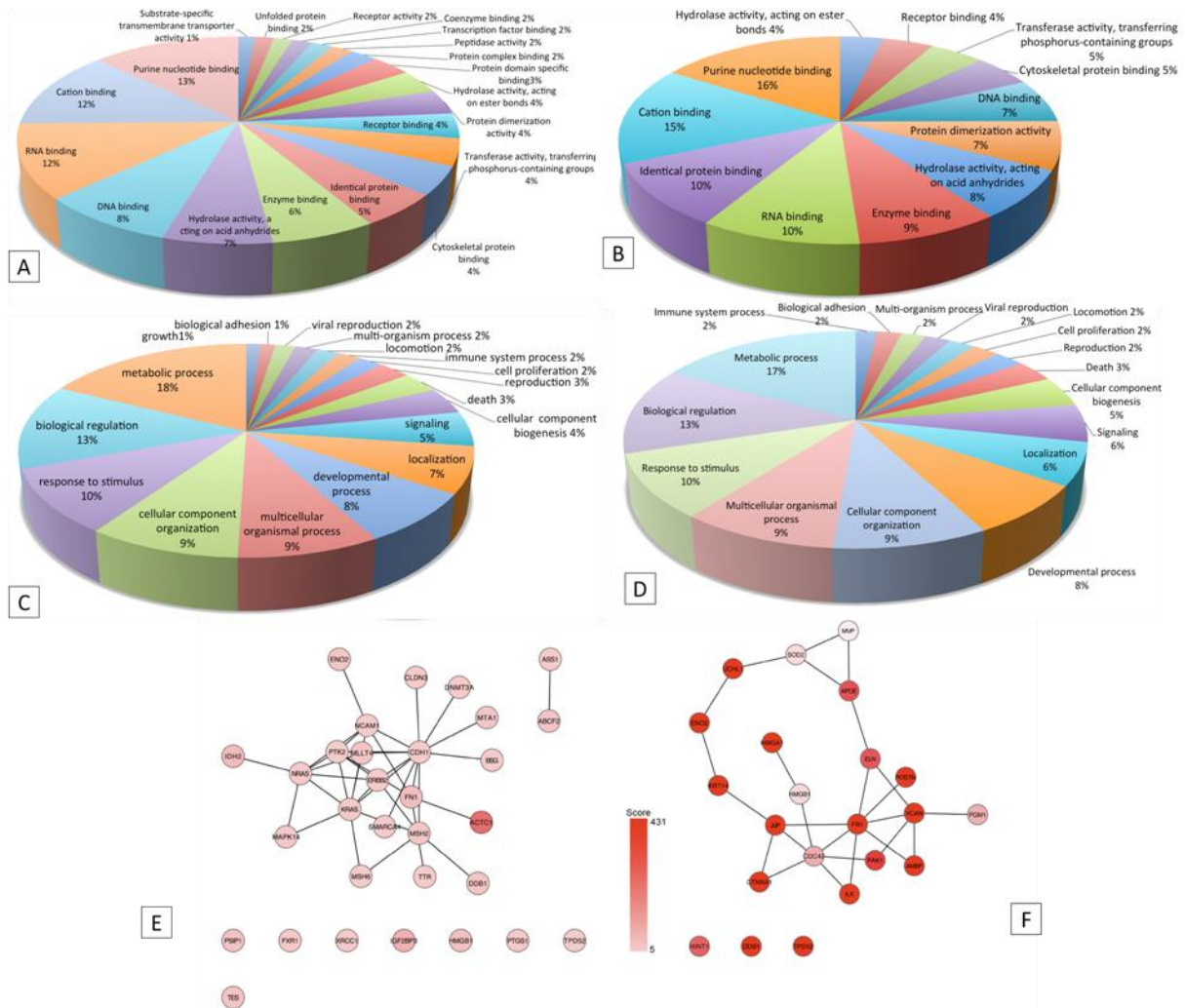


Figure 61 : distribution des fonctions moléculaires et des processus cellulaires relatifs aux protéines spécifiques des cancers de l’ovaire et de la trompe (a-d) et réseaux d’interaction des protéines anotées comme des protéines de néoplasie ovarienne dans la banque de donnée NCI (e, f)

Dans la **figure 61A et B** sont donc représentées les fonctions moléculaires, respectivement du cancer séreux et du cancer de la trompe. On remarque que ces deux types de cancers ont en commun une prédominance de protéines ayant des fonctions de liaison. Cependant, d’autres fonctions moléculaires viennent s’ajouter dans le cas du cancer séreux comme des fonctions de transport transmembranaire ou la fonction peptidase. Le modelage cellulaire par l’actine, la prolifération et l’adhésion intercellulaire font partie des fonctions majoritairement représentées dans le cancer séreux. Si la théorie de l’origine tubaire du cancer de l’ovaire séreux est réelle, alors la cancérisation au sein de l’ovaire serait régie par des mécanismes qui permettent la croissance tumorale et la différenciation des cellules en

épithéliums. D'autres protéines représentées dans le cancer de l'ovaire séreux sont des protéines impliquées dans la liaison aux Heat Shock Proteins (HSP), au transport et au catabolisme lipidique et l'activation de la voie MAPKinase. Ces événements sont en accord avec les découvertes précédentes de biomarqueurs du cancer de l'ovaire (143).

Dans la **figure 61 C et D** sont représentés respectivement les processus cellulaires impliquant la présence de ces protéines respectivement dans le cancer de l'ovaire séreux et dans le cancer de la trompe. On observe que les processus cellulaires impliqués sont similaires entre les deux types de cancer. Les processus métaboliques, de réponse aux stimuli, d'organisation cellulaire sont les fonctions les plus majoritairement représentées. Ces fonctions correspondent à celles majoritairement retrouvées dans divers types de neoplasies.

A ce niveau de l'analyse, il est possible de faire le lien entre les fonctions partagées et spécifiques des cancers de l'ovaire séreux et de la trompe. Nous avons observé une large sous-régulation de protéines communes entre le cancer de l'ovaire et de la trompe, dont les protéines de l'adhésion à la matrice extracellulaire et de l'immunité innée. Dans le cancer de l'ovaire séreux, les protéines spécifiques à haut scores sont des protéines impliquées dans les interactions cellule-cellule, la prolifération et le remodelage cellulaire. Dans l'idée où le cancer de l'ovaire séreux dériverait bien de la trompe, alors le processus initial consisterait au détachement des cellules tubaires de leur environnement tumoral pour migrer vers l'ovaire. Ce mécanisme correspond à un processus de métastase déjà bien connu dans le cancer de l'ovaire (143). L'évolution de ces cellules serait possible par un mécanisme d'immunosuppression au sein de leur environnement. Cela va dans le sens de la découverte du fragment Cterminal de RegAlpha (253) dans les coupes de tissu du cancer de l'ovaire. Une fois implantée dans l'environnement ovarien, la cellule tubaire peut alors proliférer et subir d'importants changements pour sa différenciation en tissu épithélial.

Ce type d'expérience nous a également permis de mettre en évidence un certain nombre de biomarqueurs hautement spécifiques des divers tissus analysés. Parmi les marqueurs du cancer de l'ovaire séreux, on trouve à très hauts scores les protéines pour le

remodelage cellulaire telles qu'actin, beta actin like protein ou microtubule-associated protein, etc. Des protéines impliquées dans le remodelage nucléaire constituent un autre groupe de protéines très représentées telles que histone H2B, histone H3, ou heterochromatin protein1 binding protein. Les modifications épigénétiques représentent un mécanisme important pour la repression de gènes et aura un rôle dans les phénomènes de cancérisation de l'ovaire (254). Dans les plus hauts scores, nous avons également trouvé des protéines impliquées dans le métabolisme telles que transketolase (255), impliquée dans la voie des pentose-phosphate souvent utilisée dans les processus cancéreux (143). Nous avons aussi trouvé des protéines la glycolyse, une autre voie métabolique utilisée dans le cancer de l'ovaire (256), telles que 6-phosphofructokinase ou enolase. Comme mentionné auparavant, des protéines impliquées dans l'interaction cellule-cellule sont représentées telles que zyxin (257) ou desmoglein. Enfin, nous avons trouvé une majorité de protéines impliquées dans la synthèse d'ARN et de protéines, avec de hauts scores. Parmi celles-ci, nous avons trouvé: heterogenous nuclear ribonucleoproteins, ribosome-binding protein, eukaryotic translation initiation factor, protein disulfite isomerase, 60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein, regulation of mRNA domain-containing protein, etc..

Toutes ces protéines ont un haut score et devraient être prise en considération pour des analyses sur de larges cohortes de patientes.

Pour ces protéines spécifiques du cancer de l'ovaire, nous avons également utilisé le plugin Reactome NCI afin de trouver les protéines qui avaient déjà été caractérisées dans les néoplasmes ovariens. Le réseau de ces protéines est représenté dans la **figure 61E**. Nous y avons trouvé des protéines impliquées dans l'activation de la voie de signalisation de Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) (257, 258) comme les GTPases KRAS (258) et NRAS(259), Mitogen-activated protein kinase 1 (MPK1), et Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2. Focal adhesion kinase 1(260) est impliquée dans la voie du récepteur à Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) et promeut l'angiogenèse via la voie des intégrines, ainsi que la voie Mitogen-activated protein kinase 3 (ERK)(261) et résulte en la progression cancéreuse. Fibronectin (FN1) est une des protéines extracellulaires qui activent la voie des intégrines (262). Cette dernière induit la polymerisation de l'actine pour le remodelage

cellulaire. Une autre protéine, Metastasis-associated protein, est impliquée dans la voie de la protéine p53 (263).

Une série de biomarqueurs spécifiques de la trompe a également pu être mise en évidence. Parmi les protéines à hauts scores, beaucoup correspondaient à des protéines déjà décrites dans le cancer de l'ovaire selon la banque de données NCI via le plug-in Reactome. Le réseau de ces protéines est représenté dans la **figure 61F**. Cet élément marque l'importance de l'usage des analyses en contexte anatomique, dans la mesure où aucun marqueur de la trompe n'a pu être retrouvé dans le contexte de cancer tubaire. Nous avons également retrouvé Periostin. La présence de cette protéine a été reportée dans l'environnement de beaucoup de types cellulaires cancéreux. Periostin est un composant de la matrice extracellulaire qui agit comme un ligand pour les intégrines alpha-V/beta-3 et alpha-V/beta-5 pour permettre l'adhésion et la migration de cellules épithéliales (264). Cette liaison permet aussi le recrutement de EGFR et l'activation des voies de signalisations médiées par Akt/PKB (Protein Kinase B) et FAK (Focal Adhesion Kinase) (264). L'activation des voies de signalisation par Periostin permettent la survie cellulaire, l'angiogenèse et la métastase dans le cadre du cancer de l'ovaire (265, 266). Dans ce cas particulier, nous avons trouvé Periostin spécifiquement exprimée dans l'environnement du cancer de la trompe non dans l'environnement du cancer de l'ovaire.

Ce fait marque l'importance de prendre en compte le contexte anatomique pour des analyses en protéomique. Nous avons pu prouver qu'un marqueur, auparavant considéré comme un marqueur ovarien, est en fait un marqueur de la trompe. Ceci n'a été possible qu'en comparant le pool de protéines du cancer de la trompe avec celui du cancer de l'ovaire. Cette stratégie permet donc d'obtenir des biomarqueurs plus spécifiques.

Cela permet aussi de donner un élément de réponse à la problématique de l'origine du cancer de l'ovaire. Periostin, spécifiquement située dans le tissu du cancer de la trompe, pourrait induire la métastase de cellules qui se dirigeraient vers un organe hôte tel que l'ovaire et y évoluer en tumeur ovarienne.

Un autre biomarqueur du même type, Osteopontin qui induit également la migration et la prolifération cellulaire via la liaison aux intégrines (267, 268), avait auparavant été trouvé dans les cancers de l'ovaire épithéliaux et avait été sélectionné avec 5 autres pour la détection du cancer de l'ovaire via l'utilisation multipléxée de ces biomarqueurs (269).

En conclusion, il a été possible de donner un aperçu des mécanismes communs et spécifiques des cancers de l'ovaire séreux et de la trompe. Cela n'a été possible que grâce à des analyses protéomiques respectant le contexte anatomique des échantillons tissulaires. De plus, cette méthode, appliquée à la comparaison de plusieurs tissus de natures proches, permet d'établir l'existence de biomarqueurs de pathologies bien plus spécifiques.

Nous avons prouvé que la stratégie d'analyse sur coupes de tissus dans le respect du contexte anatomique présente d'énormes avantages par rapport à des approches plus classiques. Elle nous a permis dans ce cas précis d'apporter quelques éléments de réponse à la question de l'origine du cancer de l'ovaire et de prouver que la comparaison de différents tissus au sein d'une même patiente permettait de mettre en évidence des biomarqueurs spécifiques des différentes pathologies, en un nombre limité d'expériences. Bien qu'il serait nécessaire de répéter ce travail pour d'autres cas sélectionnés, le fait de comparer des tissus provenant de la même patiente constitue un contrôle important de l'expérience.

Les résultats des deux premières parties de ce manuscrit démontrent l'importance de l'approche d'analyse par spectrométrie de masse MALDI sur coupes de tissu. Il a été possible de procéder, avec l'utilisation d'autres techniques de protéomique, au criblage général de biomarqueurs sur des biopsies de cancer de l'ovaire. L'identification de certains d'entre eux a été possible et la validation du fragment Cterminal de Reg-Alpha a été possible, avec l'utilisation de techniques d'extractions de protéines sur coupes. Les problématiques de recherche de biomarqueurs et de la recherche de l'origine du cancer de l'ovaire ont pu être étudiées grâce à cette méthode.

Divers mécanismes biologiques ont alors pu être distingués dans les cancers de l'ovaire épithéliaux. Beaucoup des marqueurs identifiés sont des acteurs des mécanismes de prolifération cellulaire et de métastase.

Il a été prouvé que de nombreuses protéines impliquées dans ces mécanismes nécessitent d'être maturées avant pour leur activation dans les fonctions des cellules acquises pour la cancérisation. Parmi les enzymes nécessaires à cette maturation, les proprotéines convertases apparaissent être très influentes à toutes les étapes de la progression cancéreuse.

L'étude de l'implication des proprotéines convertases dans le cancer de l'ovaire est décrite dans la troisième et dernière partie de ce manuscrit. Une lignée cellulaire modèle a été utilisée pour la modulation de certaines des proprotéines convertases et la mesure de leur impact sur les différentes caractéristiques cancéreuses des cellules.

**Partie 3 : Détermination de l'implication des proprotéines
convertases dans le cancer de l'ovaire**

Cette partie porte sur une investigation purement biologique dans ce présent manuscrit. Dans le cadre de la cotutelle de doctorat, une partie de celui-ci a consisté à l'étude de la potentielle implication des proprotéines convertases dans le cancer de l'ovaire.

Comme mentionné dans l'introduction, les proprotéines convertases sont des enzymes clés de la maturation de différentes protéines impliquées dans de nombreux processus biologiques. Depuis les années 1990, la démonstration de leur implication dans de nombreux types de cancers a été de plus en plus en plus détaillée. Définir l'implication relative des différentes convertases dans différents types de cancers pourrait permettre de considérer certaines d'entre elles comme de potentielles cibles pharmacologiques.

Les proprotéines convertases sont des protéases à sérine clivant après les acides aminés basiques contenus dans le motif consensus RXK/RR et leur séquence minimale est RXXR. La spécificité relative de ces enzymes est très difficile à définir *in vitro*, étant donné leur forte homologie au niveau du domaine catalytique. De plus, dans la cellule, la présence des différents membres de cette famille d'enzymes est balancée par des régulations qui définissent leurs contributions relatives.

3.3.1. Stratégie d'investigation

Pour connaître l'implication d'une PC dans un contexte physiopathologique, il est nécessaire de travailler sur un modèle cellulaire approprié. Plusieurs approches sont alors envisageables. Dans le cas des études sur le cancer, il serait possible de surexprimer une PC de manière stable dans une lignée cellulaire et de déterminer si les caractères cancéreux de cette lignée sont augmentés. Cependant la surexpression pourrait engendrer des artefacts importants. Comme mentionné dans le chapitre 1, les proprotéines convertases ont une localisation intracellulaire définie et l'augmentation de l'expression de l'une ou l'autre des convertases pourrait modifier sa localisation. De cette façon, des substrats connus pour être impliqués dans des mécanismes de cancérisation pourraient être maturés uniquement dans le contexte où la PC est surexprimée. Les propriétés de cette nouvelle lignée seront alors

induited par l'action de substrats qui n'existent pas naturellement et l'évaluation de celles ci sera donc artéfactuelle.

La meilleure approche pour l'étude de l'action des proprotéines convertases dans le cancer sur modèles cellulaires est donc la création de lignées sous exprimées en PC d'intérêt. Une concentration de PC intracellulaire diminuée résultera en une plus faible quantité des substrats endogènes responsable des caractères cancéreux. Pour les lignées pour lesquelles la PC sous régulée est responsable la malignité, une atténuation des caractères cancéreux devrait alors être observée.

Le but du travail a donc été de créer des lignées de cellules SKOV3 dont la quantité de PC est diminuée afin d'observer si les caractères d'agressivité de ces cellules pourraient être atténués.

3.3.2. Détermination de l'expression des PC dans le modèle cellulaire SKOV-3

Dans un premiers temps, la quantité relative des différentes convertases a été déterminée par PCR quantitative. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la **figure 62**.

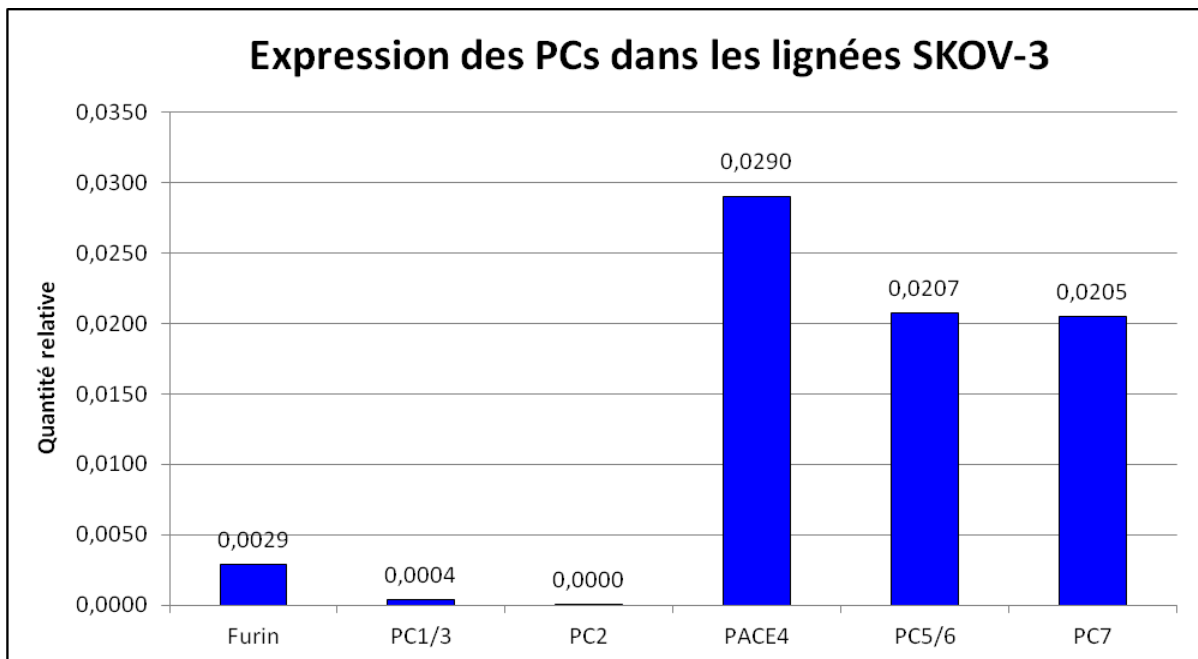


Figure 62: Expression des PC dans la lignée cellulaire SKOV3.

Ces mesures montrent que les PCs présentes en abondance dans le cancer la lignée cellulaire SKOV3 sont furine, PACE4, PC5/6, et PC7.

Nous avons donc décidé de concentrer nos études sur les convertases, qui parmi celles-ci, avaient été décrites comme étant particulièrement impliquées dans différents types de cancer, à savoir la furine, PACE4, et PC7. Des lignées knock down de chacune de ces PC ont alors été créées afin de déterminer le niveau de « redondance fonctionnelle » de chacune d'entre elle.

3.3.3. Knock Down des PC dans les cellules SKOV3

Pour la création de lignées déficitaire en PCs, des shRNAs délivrés par infections lentivirales ont été utilisés (270). Le fonctionnement de cette approche est illustré dans la **figure 63**. Des cellules de cancer du rein de la lignée HEK293T, sont utilisées pour la production de virus contenant une cassette plasmidique codant pour un ARN complémentaire des transcrits de la proprotéine convertase à étudier. Ces cellules sont transfectées avec les gènes essentiels à l'encapsidation virale en présence du plasmide contenant le shRNA et le gène de sélection. Les virus produits servent à délivrer le shRNA la lignée cellulaire afin que l'ARN viral contenant la séquence complémentaire de la PC soit transmis à la cellule pour être rétro transcrit au sein de la cellule et intégré dans son génome. Cela permet ainsi la création d'un transfectant stable (270). A partir de cette séquence, est produit un ARN small hairpin (shRNA) qui sera détruit par le complexe DICER dans le cytoplasme afin de former un small inhibitor RNA (siARN). Celui-ci ciblera spécifiquement les transcrits ARN de la PC et l'ARN double brin formé sera ensuite détruit, conduisant ainsi à la délétion des transcrits naturels de PC de la cellule. Cette méthode permet de créer des lignées stables produisant en permanence des siRNA (270). C'est une alternative efficace à l'utilisation de siARN directement délivrés aux cultures de cellules. Cette méthode apparait en effet plus fastidieuse et plus coûteuse. Elle nécessite de réaliser une transfection de ces siRNA à partir d'une lignée d'intérêt afin d'observer un effet pendant quelques jours. Cette méthode est également très coûteuse en matériel nécessaire pour la transfection (lipofectamide) et pour la création des siRNA. De plus, les siRNA ont pour autre désavantage de ne pas pouvoir être utilisés in vivo, par exemple dans le cas de xéno greffes, contrairement aux shRNA qui assurent un silençage continu du gène cible (271).

La technologie des shRNA est à ce jour largement démocratisée pour diverses applications en biologie pour l'étude de la fonction de protéines dans des domaines comme la virologie et la cancérologie (272-284). La stratégie shRNA a très récemment été utilisée pour la fabrication d'un vaccin contre le cancer validé en phase I. Celui-ci consiste en un plasmide codant pour un shRNA ciblant les transcrits de furine et donc réduisant la maturation des facteurs de croissance immunosuppressifs TGFβ1 et TGFβ2 (285).

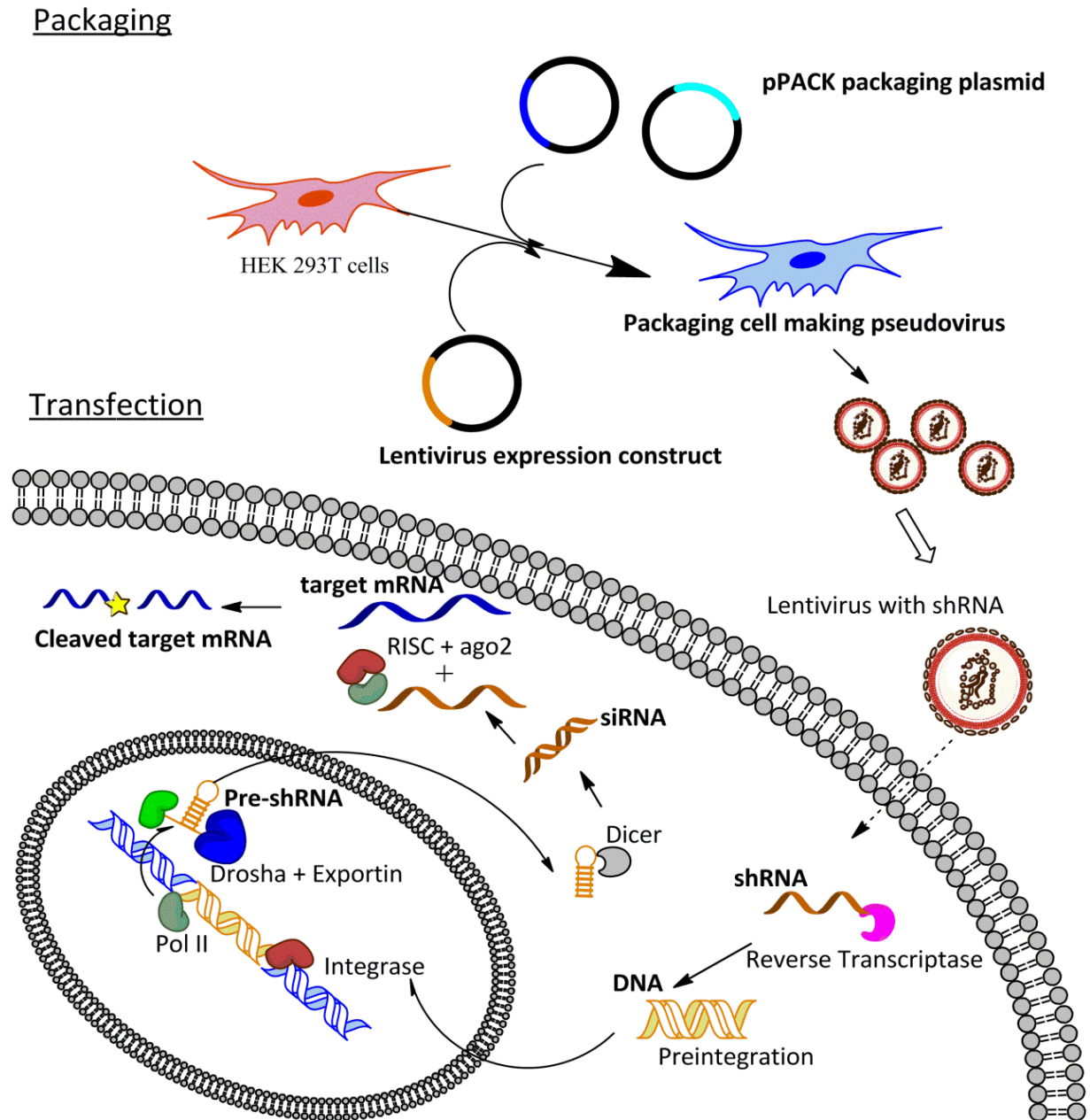


Figure 63: Schématisation de la technologie des shRNA (286)

3.3.3.1. Mesure du Knock Down des PC

Pour chaque PC, il existe cinq séquences commercialement disponibles pour la création de shRNA. Parmi ces 5 séquences, deux apparaissent comme relativement plus efficaces que les autres. Ces deux séquences ont donc été utilisées pour la création de deux lignées de cellules shPC, pour chaque proprotéine convertase. Une lignée contrôle est également créée, appelée Non Target qui contient une séquence en acides nucléiques qui ne cible aucune séquence connue du génome. Les résultats de PCR quantitative de chaque PC sont présentés dans les **figures 64 à 67**.

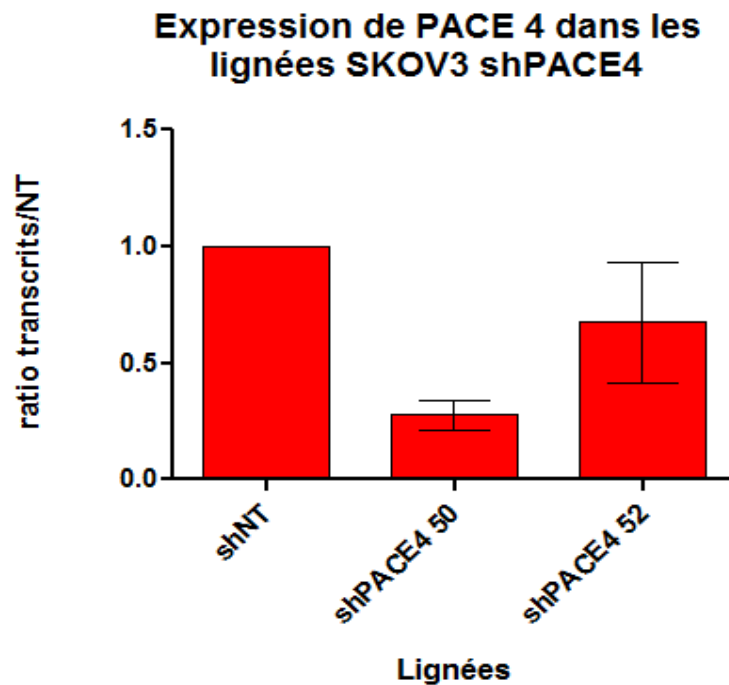


Figure 64: Expression de PACE4 dans les différentes lignées SKOV3 shPACE4

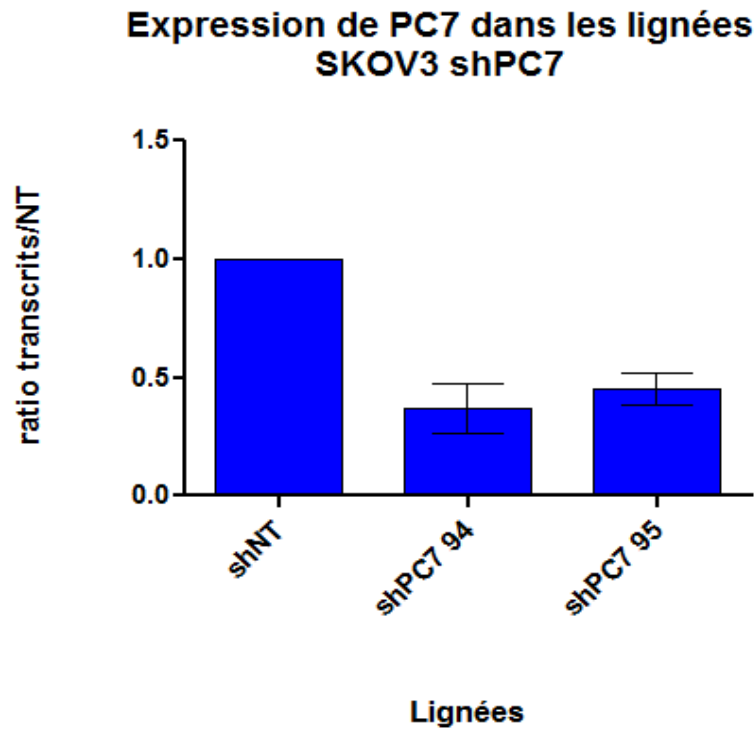


Figure 65: Expression de PC7 dans les lignées SKOV3 sh PC7

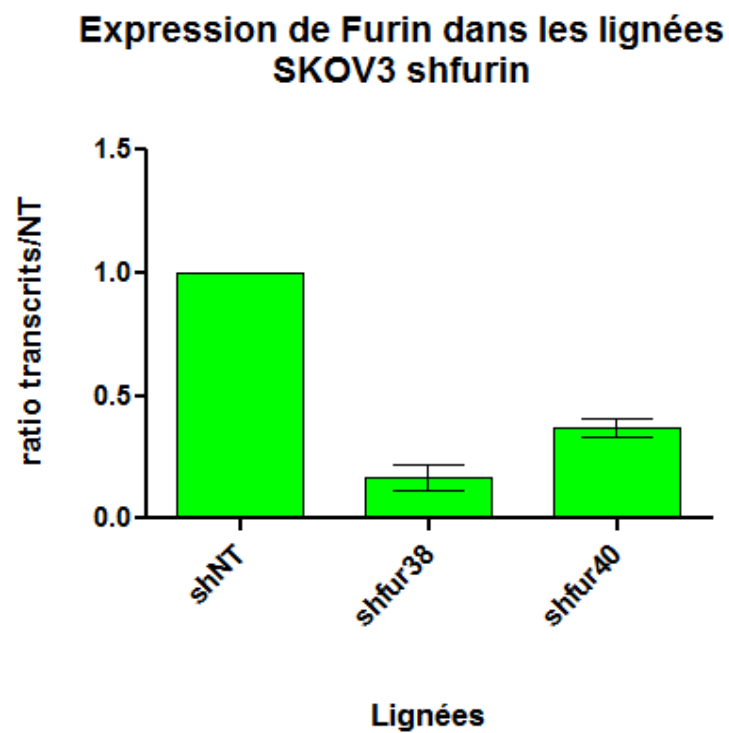


Figure 66 : Expression de Furine dans les lignées SHO3shFurine

Expression de PC5/6 dans les lignées SKOV3 shPC5/6

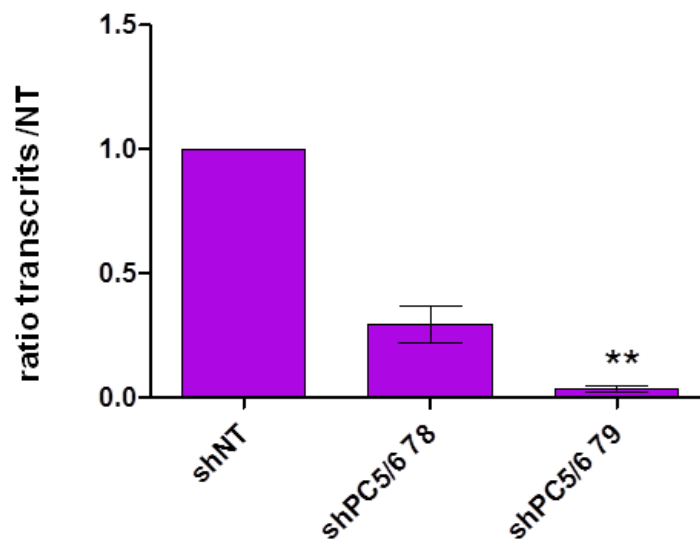


Figure 67: Expression de PC5/6 dans les lignées SKOV3 sh PC5/6

Pour chaque lignée, une séquence sh est plus efficace que l'autre et sera donc utilisée pour la suite des expériences. Les lignées utilisées seront donc shPACE4-50, shPC7-94, shPC5/6-79 et shfur-38.

3.3.3.2. Test de la prolifération des lignées KD

Des tests peuvent alors être réalisés sur les différents types de lignées cellulaires. La première question posée est celle de l'implication des différentes protéines convertases dans la prolifération cellulaire en général, bien que cette caractéristique dépende de plusieurs autres facteurs.

La croissance relative des différentes lignées shPC devait alors être évaluée. Pour ce faire, un test XTT a été réalisé pour la mesure de la croissance des différentes lignées cellulaires sur 96h. Le test est une variante du test MTT qui consiste à la mesure du nombre de cellules vivantes dans un échantillon. Celui-ci repose sur l'utilisation du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide). Celui-ci contient un anneau de tétrazolium qui est réduit dans la mitochondrie en

formazan par la succinate deshydrogenase des cellules vivantes actives. Ceci conduit à la formation d'un précipité de couleur violette, dont la quantité est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Pour calculer la quantité relative des cellules, il est nécessaire de retirer le composé et le milieu du puits où ont poussé les cellules, et de dissoudre celles-ci avec un mélange d'isopropanol et d'acide formique puis de mesurer les DO à 550nm de chaque solution par spectroscopie (287-291). Malgré la fiabilité du test pour la mesure de la prolifération cellulaire, celui-ci s'est avéré inapplicable aux lignées SKOV3. En effet, après l'incorporation du sel de tétrazolium et la transformation en formazan, la cellule apparaît être extrêmement peu adhérente au plastique des plaques de 96 puits utilisées pour leur culture. Ce phénomène est problématique lors du retrait du milieu adduit de MTT. Les cellules peu adhérentes se décollent et ne pourront pas être solubilisées pour en mesurer le formazan qu'elles contiennent.

Le réactif XTT est un dérivé du sel de tétrazolium (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide) qui, transformé dans la mitochondrie, donne un composé de couleur orange. Ce dernier est soluble dans l'eau, ce qui permet d'éviter les étapes de retrait du milieu et de solubilisation des cellules qui nuisent à la mesure. L'absorbance est alors mesurée pour la longueur d'onde de 475nm. Ce test permet une mesure précise de la prolifération des différentes lignées SKOV3shPC (292-295).

La mesure est faite chaque jour, tous les 24h après le dépôt des cellules dans les plaques 96 puits. Les résultats de ces tests sont reportés dans la **figure 68**. Celle-ci est répétée sept fois afin d'évaluer l'écart type entre les valeurs obtenues. Les valeurs mesurées aux différents temps sont normalisées par rapports aux valeurs obtenues à 24h, afin d'éliminer les erreurs dans le nombre de cellules déposées au début de l'expérience. Les cellules déposées étant toujours en phase de latence pour leur prolifération 24h après le dépôt, la coloration XTT à 24h est en effet représentative du nombre de cellules déposées au début de l'expérience.

Les résultats montrent que la prolifération des cellules SKOV3 shPACE4 et shPC7 est significativement diminuée (d'environ 40%) par rapport aux cellules contrôles Non Target. Ceci est un premier élément pour la compréhension de l'implication des PC dans le contexte du cancer de l'ovaire.

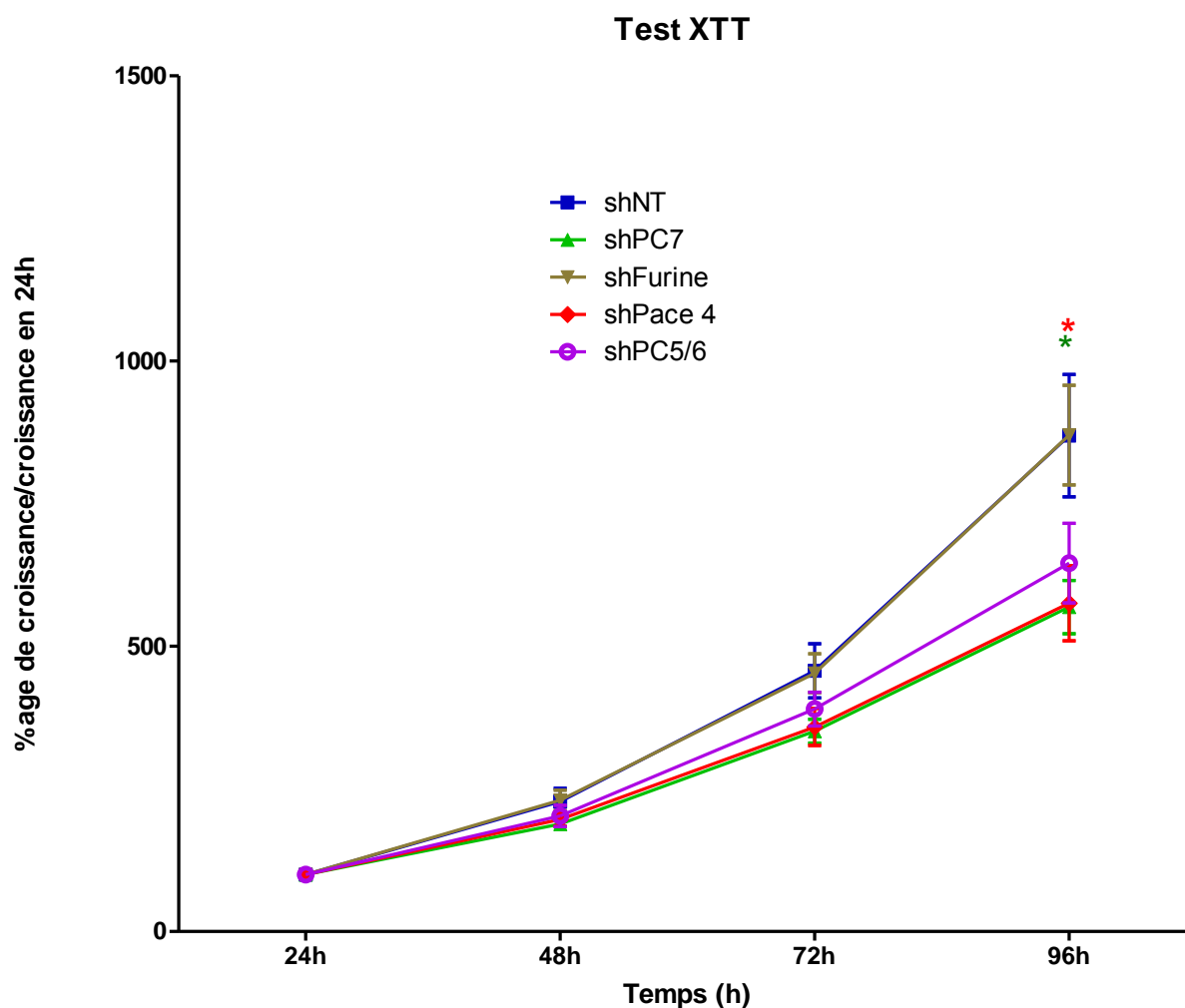


Figure 68: Test de prolifération des lignées SKOV3 shNonTarget, shFurine, shPC7, shPACE4, et shPC5/6, normalisée par rapport à la valeur de colloration XTT à 24h.

3.3.3.3. Test de la capacité des lignées KD à former des colonies

Une autre problématique pour l'étude de la propriété des cellules SKOV3 est la capacité à former des colonies. La formation de colonies donne un indice sur le potentiel d'une cellule à autosuffire à sa croissance, comme dans le cas d'une cellule unique colonisant un organe distant de la tumeur primaire. Le test utilisé, appelé test de clonogénicité consiste à déposer dans des plaques de culture cellulaire de 2mL, les cellules à une faible densité, de sorte que l'effet d'interaction entre les cellules soit négligeable pour leur croissance (296).

En effet, une grande partie des protéines de la cancérisation clivées par les PC pour leur activation sont les facteurs de croissance. Ces facteurs sont nécessaires à différentes

phases de la cancérisation pour la croissance initiale des cellules pour le développement des tumeurs et des métastases. De part le fait qu'une cellule agit indépendamment pour sa croissance dans ce type de test, celui-ci peut donner une information sur la quantité des facteurs de croissance produits par chaque cellule.

Les résultats sont présentés dans la **figure 69** ci-dessous.

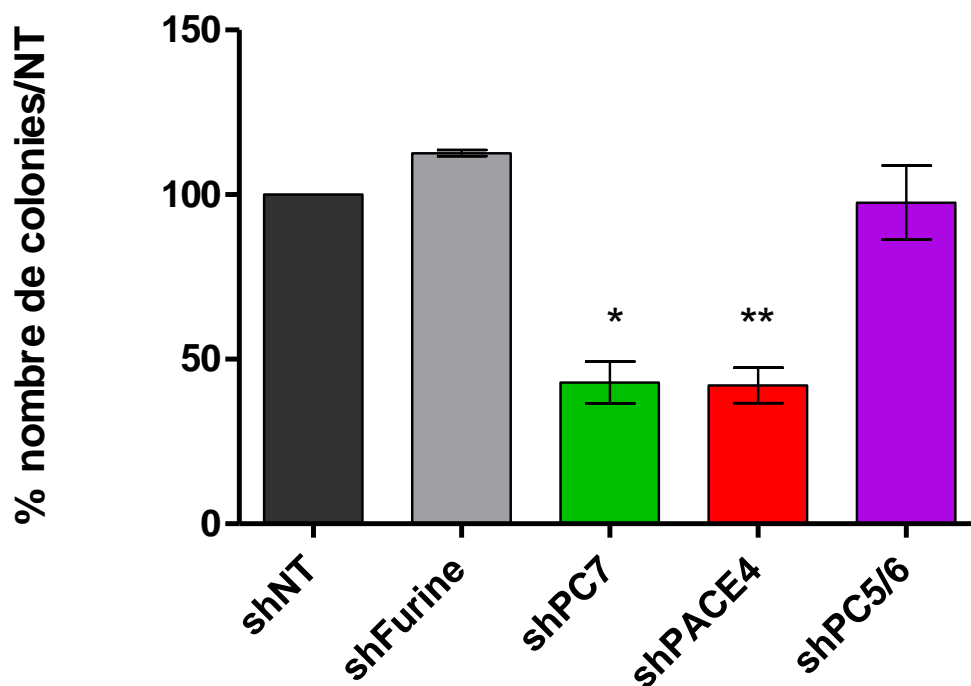


Figure 69: Test de clonogénicité des lignées SKOV3 shNT, shFurine, shPC7, et shPACE4 et shPC5/6

Les résultats du test, répétés 3 fois montrent un potentiel de formation de colonies diminué pour les lignées SKOV3 shPC7 et shPACE4 lorsqu'elles sont comparées à la lignée contrôle Non Target de manière plus significative que ce qui était observé pour les tests de prolifération. Ces valeurs suggèrent que les cellules auraient une certaine difficulté à pousser de manière autonome. Ce phénomène pourrait être expliqué par une sécrétion amoindrie en facteurs de croissance. En effet, si la cellule cancéreuse a besoin d'un niveau seuil de facteur de croissance pour se diviser, et que le Knock Down de certaines PC occasionne un effet sur la maturation de ces facteurs de croissance, alors ce seuil pourrait être plus difficile à atteindre quand la sécrétion ne se fait que de manière autocrine. Dans ces conditions, des cellules déposées en plus grande densité pourraient bénéficier de la sécrétion des cellules

environnantes et voir ce seuil rapidement atteint alors que des cellules déposées en faible nombre ne pourraient se diviser qu'après une longue période de production de facteur de croissance jusqu'au seuil adéquat. Cela pourrait être une explication de l'impact plus important des Knock Down de PC dans les tests de clonogénie que dans les tests de prolifération. Dans ce test, les lignées shFurin et shPC5/6 ont une capacité à former des colonies similaire à la lignée contrôle shNT et renforce les résultats de prolifération présentant ces enzymes comme ayant peu d'influence sur la croissance des cellules SKOV3 *in vitro*.

3.3.3.4. Test des lignées KD de PC *in vivo*

Des tests *in vivo* ont ensuite été réalisés sur modèle murin pour les lignées shPACE4, shPC7, shFurin, shPC5/6 le contrôle shNT. Le modèle de xénogreffe choisi est la création de tumeurs sous cutanées, qui est largement décrit dans la littérature (297-303). Selon les informations obtenues, un minimum de 1.10^6 cellules est requis pour la création de tumeurs sous cutanées (298). 2.10^6 cellules ont donc été injectées sous la peau de souris immunodéficientes Nu/Nu. Ces souris sont modifiées au niveau du gène FOXP1 afin de limiter la différenciation de leurs lymphocytes T au niveau du thymus et ainsi éviter la réaction immunitaire qui pourrait être provoquée par l'implantation de cellules cancéreuses. Une deuxième modification génétique permet d'obtenir des souris sans poil, permettant leur meilleure manipulation et la meilleure visualisation de la croissance des tumeurs. Une mesure a été réalisée tous les trois à quatre jours pour le suivi de la croissance des tumeurs. Les résultats de la croissance des tumeurs sont présentés dans la **figure 70**.

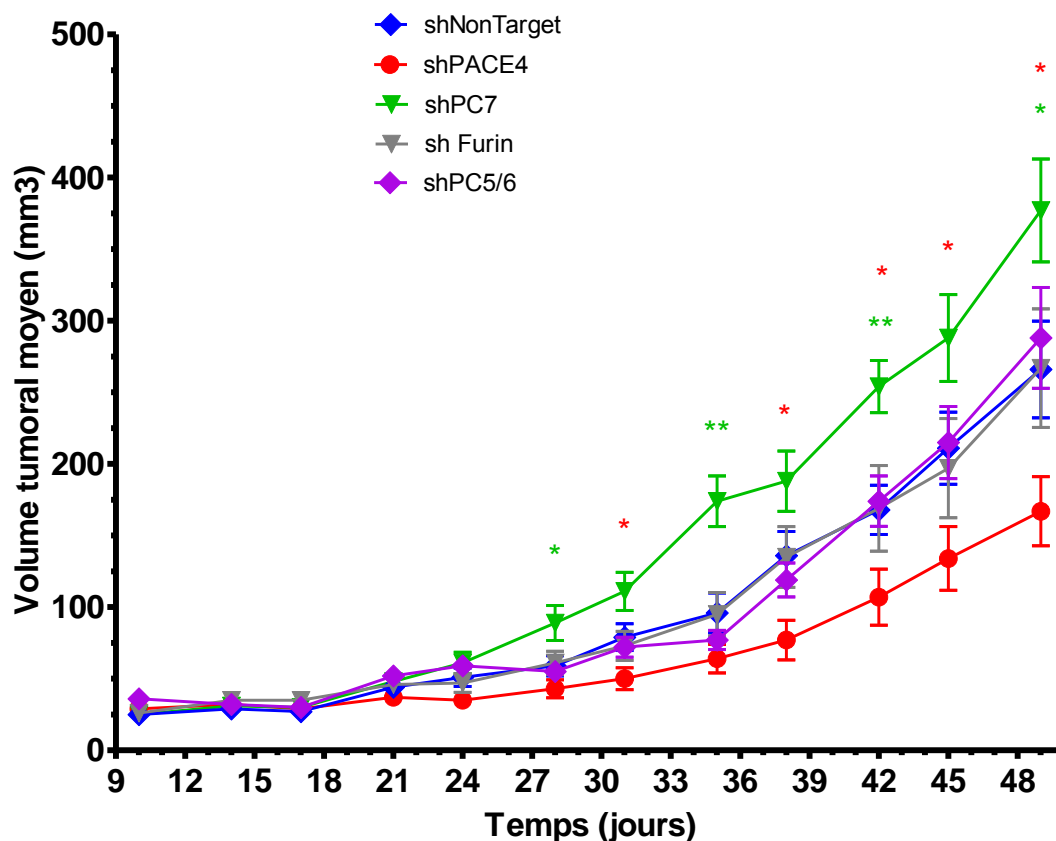


Figure 70 : Volumes moyens des tumeurs de lignées SKOV3 shNonTarget, shPACE4, shPC7, shFurin, shPC5/6 au cours du temps après implantation.

Comme reporté dans la littérature, une phase de latence est observée pour la formation des tumeurs avant l'entrée de celles-ci dans une phase de croissance exponentielle (298). Dans le cas présent, cette phase dure environ 30 jours. Pendant cette période, les tumeurs montrent une augmentation puis une diminution de leur volume avant d'entrer dans la phase exponentielle. D'après les résultats, il semblerait que la phase de latence pour la lignée PC7 est inférieure à celle des autres lignées.

Après cette période de latence, les tumeurs croissent de manière exponentielle. On observe alors qu'après 12-13 jours après cette phase de latence, les tumeurs issues de l'implantation des lignées SKOV3shPACE4 ont une taille significativement inférieure aux tumeurs issues de la lignée contrôle shNon Target, et ce sur toute la durée de l'expérience. Les lignées shFurin et shPC5/6 ont une croissance similaire au témoin shNonTarget. Cependant, les tumeurs issues de la lignée shPC7 ont une croissance plus rapide que les

tumeurs contrôles. Ces résultats vont dans les sens inverse des résultats obtenus par test de prolifération. Dans une autre étude, des résultats similaires ont été obtenus avec des tumeurs issues de lignées cellulaires du cancer de la prostate (Couture et coll. article en rédaction).

Une hypothèse pour expliquer ce phénomène pourrait être la suivante : le modèle cellulaire ici utilisé serait un modèle inverse au processus de métastase du cancer de l'ovaire. Dans le processus de métastase, les cellules tumorales perdent leur caractère épithélial par mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse afin de pouvoir se détacher de leur environnement tumoral et migrer à travers la cavité péritonéale vers de nouveaux foyers de croissance. Dans le cas présent, des cellules provenant d'une lignée cellulaire, donc n'ayant pas de différenciation épithéliale sont implantées dans un environnement tissulaire. Les cellules doivent alors utiliser un processus inverse pour se différencier en épithélium et établir la formation d'une tumeur. La phase de latence observée correspondrait alors à l'organisation de ce processus.

On peut facilement imaginer que dans lignées SKOV3 shPC7, d'autres protéines convertases compensent l'absence de PC7. Ces PC de « compensation fonctionnelle » pourraient être alors les PC préférentiellement responsable de la maturation de substrats responsables de la différenciation de la cellule en lignée épithéliale. Cela expliquerait pourquoi la phase de latence des cellules shPC7 serait plus courte.

La croissance des tumeurs SKOV3 shPACE4 concorde cependant avec les données de prolifération cellulaire, et de clonogénicité préalablement obtenues et celles obtenues avec le cancer de la prostate (152).

A la fin de l'expérience, une pesée des tumeurs est effectuée. Les résultats de ces pesées sont présentés dans la **figure 71**. Ceux-ci concordent avec les résultats préalablement obtenus par la mesure des tumeurs sur la souris. Les poids des tumeurs des lignées shPC7 sont significativement plus hauts que ceux des lignées shNonTarget, et l'inverse est observé pour les tumeurs de la lignée shPACE4.

Pesée des tumeurs jour 50

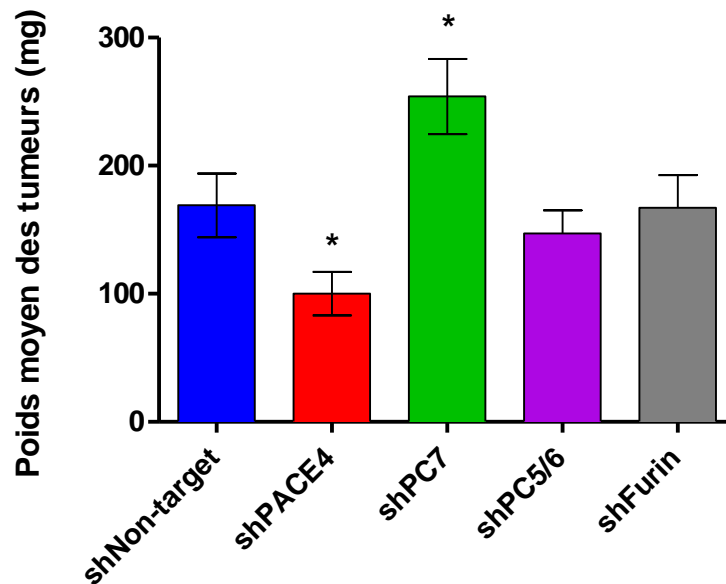


Figure 71: poids moyen des tumeurs des différentes lignées 50 jours après implantation.

Dans la **figure 72**, sont montrées les tumeurs sur souris et après résection pour les lignées shPACE4 et shNonTarget. On peut remarquer grâce à l'échelle, la plus petite taille des tumeurs shPACE4 et leur plus faible vascularisation, plus visible avant résection, sur l'animal.

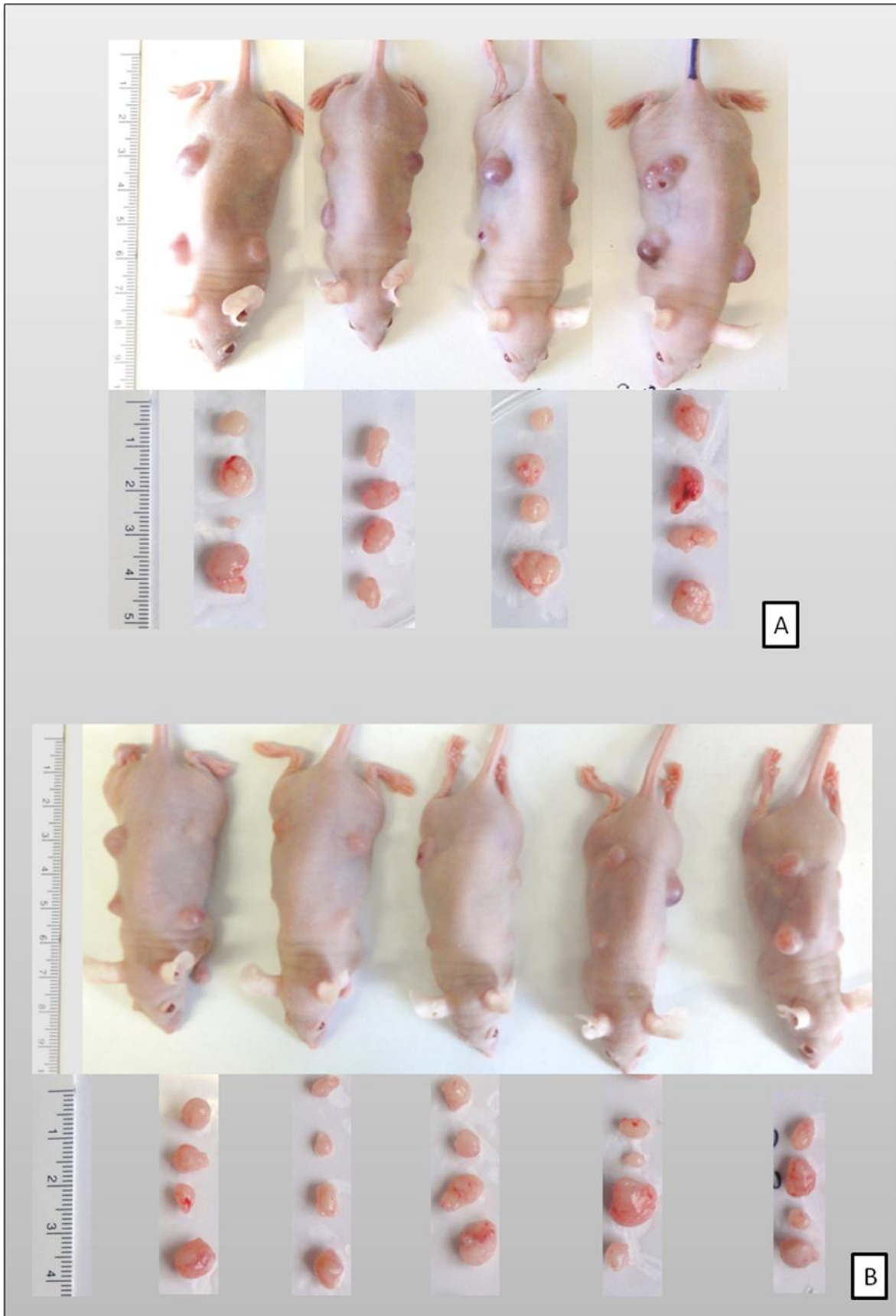


Figure 72 : Souris Nu/Nu xéno greffées avec les lignées SKOV3 shNonTarget (A) et shPACE4 (B) et tumeurs reséquées.

L'ensemble de la démarche scientifique pour l'étude de l'implication des PC dans le cancer de l'ovaire montre ainsi l'importance de chaque étape. Des tests sur les lignées cellulaires sont requis pour valider l'implication de chacune des PC d'intérêt dans la lignée cellulaire étudiée. Cependant, seul le test *in vivo* permet de donner une indication de la pertinence de l'implication de la PC en question dans le modèle de pathologie.

Cette démarche nous a permis de prouver que PACE4 apparait comme un élément majeur dans la progression tumorale du cancer de l'ovaire. Cet enzyme avait auparavant été démontré par notre équipe comme étant la PC la plus importante parmi les autres convertases dans le cancer de la prostate (152). Des données ont également montré son importance dans un autre modèle cellulaire (Couture et coll. données non publiées). On peut alors imaginer son importance dans une gamme encore plus importante de néoplasies. PACE4 jouerait un rôle prédominant dans le clivage de substrats importants dans la progression de nombreuses affections néoplasiques. Il serait alors intéressant de quantifier les PC aux niveaux transcriptomiques et protéomiques au sein de la tumeur. La découverte d'une forte concentration de transcrits de PACE4 dans les tumeurs de lignées Knock Down des autres PC renforcerait les idées suivantes: d'une part PACE4 est la principale PC impliquée dans le cancer de l'ovaire et il existe une « redondance fonctionnelle » entre les différents membres de PC.

3.3.4. Perspectives

Un grand nombre de perspectives s'ouvrent au vu de ces travaux. Tout d'abord, les mêmes expériences devraient être faites sur d'autres lignées cellulaires, d'autres types de cancer de l'ovaire épithéliaux. De plus, il serait intéressant de savoir quels mécanismes biologiques sous-jacents à l'action des protéines convertases sont impliqués. L'impact des PC sur les voies de signalisation, l'apoptose, la croissance cellulaire via la maturation de récepteurs, de facteurs de croissance, devrait être étudié. Des analyses protéomiques seraient envisageables afin d'avoir une vision globale des acteurs moléculaires impliqués dans l'action des protéines convertases. Une dimension cinétique serait également à greffer à cette analyse pour les études *in vivo* afin de connaître les mécanismes sous-jacents à la phase de latence pour la formation des tumeurs pour chaque lignée cellulaire. L'analyse des tumeurs en

phase exponentielle pourra également renseigner des protéines qui déterminent la différence de croissance significative entre les différentes lignées. Une série de marqueurs pourra alors être obtenue, et ceux-ci auront une relation directe ou indirecte à l'action enzymatique de la PC d'intérêt. Ces marqueurs pourront alors être comparés à ceux obtenus par analyses protéomiques obtenus sur les tissus de patientes. Enfin, les biomarqueurs d'intérêt pourront être recherchés dans le sang de la souris. Ces biomarqueurs seront alors envisageables pour une potentielle utilisation pour le suivi de l'efficacité thérapeutique d'inhibiteurs de proprotéines convertases.

A ce niveau, une série de peptides a été développée au sein du laboratoire de Robert Day, ayant une action plus ou moins ciblée sur certaines proprotéines convertases, dont PACE4. Cet enzyme étant visiblement important pour l'agressivité des cellules SKOV3, il serait possible d'utiliser un inhibiteur spécifique de PACE4 pour le traitement de tumeurs du cancer de l'ovaire. Cela constituerait une stratégie de thérapie ciblée idéale dans la mesure où l'inhibiteur ne ciblerait que PACE4. Selon le principe de « redondance fonctionnelle » décrit ci-dessus, l'action de ce peptide ne serait alors pas délétère aux autres cellules. PACE4, largement exprimée dans les cellules du cancer de l'ovaire serait la cible thérapeutique, mais sa compensation fonctionnelle par les autres PC n'aurait aucun effet sur l'effet thérapeutique du peptide, les autres PC n'étant pas ou étant peu impliquées dans les mécanismes de cancérisation. Ces cellules saines, inévitablement également touchées par l'inhibiteur de PACE4 pourrait tirer profit de ce phénomène de compensation fonctionnelle et des PC de compensations pourraient alors agir pour une maturation des substrats naturels, sans complication majeure.

Le suivi de l'action du traitement pourra également être réalisé par une approche de recherche de biomarqueurs. Les marqueurs de l'action de PACE4, préalablement trouvés pourront alors être recherchés dans le sang de la souris et dans les tumeurs, par analyses protéomiques ou analyses directes sur coupe. La cinétique de présence de ces marqueurs sera à mettre en relation avec l'efficacité sur traitement sur la régression de la tumeur.

Ces objectifs, illustrés dans la **figure 73** ouvriraient de nombreuses applications dans les domaines de la recherche de biomarqueurs ainsi qu'en pharmacologie. Pour la première fois, il serait alors possible de combiner ces deux domaines en un projet commun. Par la même occasion, l'action de PACE4 dans le cancer de l'ovaire et d'autres modèles néoplasies

pourraient alors être explorée au travers de tous les substrats directs ou indirects à son action enzymatique, impliqués dans la progression des différents cancers.

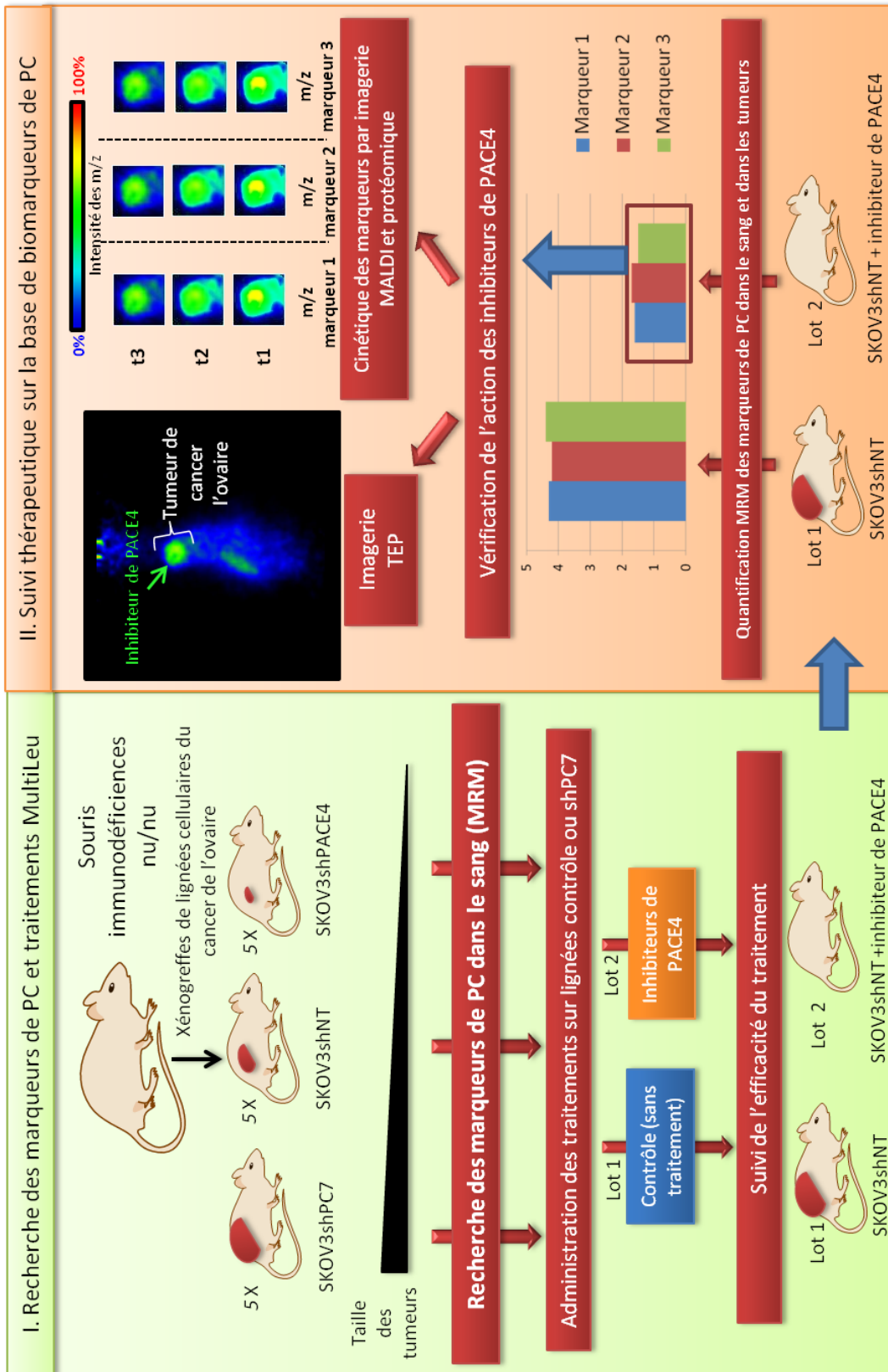


Figure 73 : Perspectives aux expériences *in vivo* des lignées shPC : applications pour la recherche de biomarqueurs et de suivi pharmacologique.

Conclusion générale et perspectives

Les approches pour l'étude des molécules de la physiologie et des pathologies n'ont cessé de se diversifier depuis l'avènement des biotechnologies permettant l'amplification, la purification et l'identification de biomolécules. L'implication des protéines dans un large éventail de processus biologiques font la force de la biochimie et plus récemment de la protéomique. Cette jeune science consiste à étudier l'ensemble des protéines d'un échantillon biologique à un temps donné. Elle permet de tracer les grandes lignes des processus biologiques impliqués dans un contexte physiopathologique, via l'identification simultanée d'une grande partie des protéines contenues dans un échantillon. Depuis l'avènement de ces approches, la diversification des procédés a permis au chercheur de s'adapter à de multiples problématiques scientifiques. La spectrométrie de masse est depuis plusieurs dizaines d'années, devenue la technique la plus utilisée pour des analyses en protéomique.

Elle est en effet largement utilisée comme instrumentation pour l'identification de protéines purifiées et séparées de diverses façons. Les protéines peuvent en effet être séparées par des méthodes en gel et ensuite identifiées individuellement par empreintes peptidiques par spectrométrie de masse MALDI, avec en support des analyses MS/MS. Les spots séparés peuvent également être digérés et soumis à séparation en phase liquide puis analyse par spectrométrie de masse ESI. L'information protéique est en effet tellement riche que des protéines présentes dans un spot peuvent être nombreuses. La technique peut être encore simplifiée lorsque le mélange protéique est directement digéré et soumis à analyse LC-MS. A cela, diverses adaptations pour la quantification des protéines peuvent être utilisées.

Toutes ces analyses permettent de travailler sur un extrait de protéines provenant d'un échantillon d'intérêt. Mais elles ne permettent pas de garder le contexte spatial d'un échantillon. Pour la problématique d'analyses histopathologiques, il est important de discriminer les différentes zones tissulaires afin d'en faire le différentiel moléculaire. Une approche est alors possible, qui est la microdissection laser qui permet de sélectionner un groupe de cellules d'intérêt pour en faire l'analyse. Mais cette technique fastidieuse a engendré l'idée, chez de nombreux chercheurs de faire une analyse sur un échantillon brut.

Les analyses MALDI sur des coupes de tissus ont alors été pensées et la méthode développée. Il est désormais possible d'ajouter à une analyse histopathologique, une dimension moléculaire. Il nous est possible de différencier des types tissulaires sur une base moléculaire. Au cours des années, divers développements ont été réalisés pour l'amélioration

de l'extraction chimique des biocomposés et l'analyse informatique de celles-ci. Certains de ces développements ont été présentés dans ce manuscrit.

Dans un premier temps, il a été utile de développer différentes approches qui permettent d'élargir la gamme de détection des protéines sur coupe. L'analyse sur coupe, jusqu'à quelques années auparavant était limitée à des m/z allant jusqu'à 30000. Diverses méthodes pour la dénaturation des protéines, leur extraction à la surface des coupes et leur incorporation à la matrice ont alors été développées et présentées dans ce manuscrit. Ce type d'amélioration nous a permis, uniquement grâce à l'utilisation d'un solvant de solubilisation autre que les mélanges de solvants habituels, le HFIP, d'extraire des protéines à des m/z jusqu'à 70000. De plus, l'utilisation d'instrumentations adaptées, comme des détecteurs conçus pour analyser des protéines de hautes masses moléculaires, nous a permis de cartographier certaines de ces protéines de hautes masses moléculaires sur coupes de tissu de cerveau de souris. L'utilisation de solvant a pu être faite pour la pré-solubilisation de tissus et la séparation de leurs protéines en gel d'électrophorèse bidimensionnelle.

Le deuxième axe de développement fût l'utilisation de calculs par PCA et de classification hiérarchique pour la discrimination des différentes sous classes de tissus sur une base moléculaire. Des essais sur le modèle de cancer de la prostate nous ont permis de prouver que des sous types tissulaires de natures inconnues sont différenciables sur une base moléculaire préalablement établie sur des tissus de natures connues. L'analyse de recherche de biomarqueurs est ensuite possible en utilisant la PCA sur des régions d'intérêt et non sur l'ensemble de la coupe de tissu analysée en imagerie MALDI, qui ajouterait une complexité à l'analyse.

Ces différents développements ont alors pu être réalisés pour des applications pour la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire, sur une large cohorte de patientes. Des analyses directes sur coupe pour une cohorte de tissus nous ont permis de discriminer des familles de marqueurs moléculaires de différentes gammes de masse sur une base d'analyse moléculaires par PCA et pseudogels. Parallèlement, des calculs PCA sur des images MALDI nous ont permis de valider la présence du fragment C-terminal de Regalpha, un marqueur préalablement découvert dans les zones malignes de biopsies du cancer de l'ovaire. Ce marqueur révèle un mécanisme important d'immunosuppression dans le cancer de l'ovaire. PA28, ou RegAlpha constitue l'activateur de l'immunoprotéasome 11S. Cette forme du protéasome est retrouvée lors d'infection virales ou bactériennes et permet la dégradation

rapide de protéines intracellulaires pour une présentation au CMH de classe I. Son absence dans sa forme native signe un mécanisme de dégradation qui donne à une cellule infectée l'avantage de ne pouvoir être détectée comme étrangère vis-à-vis du système immunitaire.

Ce marqueur a finalement pu être confirmé au niveau anatomopathologique par des méthodes classiques d'immunohistochimie, en parallèle à l'utilisation de notre méthode d'extraction nouvellement développée. En effet, nous avons pu prouver l'efficacité de cette méthode pour une utilisation clinique dans le cadre de la recherche de biomarqueurs. Cette méthode pourrait remplacer les techniques déjà connues d'immunohistochimie et apparaîtrait comme une approche d'antigen retrieval pour le démasquage de certains composés sur coupe de tissu frais et pourrait être envisagée pour une utilisation en anatomopathologie.

Les analyses PCA ont été appliquées à une autre problématique importante du cancer de l'ovaire qu'est la détermination de l'origine cellulaire des différents épithélium cancéreux. La connaissance du tissu réellement responsable de chacune des pathologies pourrait en effet avoir un impact important sur la prise en charge des patientes au niveau chirurgical. Dans bien des cas, la chirurgie consiste au retrait de l'ensemble ou d'une majeure partie du tractus génital, causant de nombreux problèmes dans la vie personnelle des patientes. Si selon une théorie récemment avancée, et dont la démonstration est faite par plusieurs groupes de pathologistes, les différents types de cancers de l'ovaire épithéliaux auraient une origine autre que l'ovaire, alors il serait possible sauver une partie des ovaires affectés. Cette nouvelle prise en charge permettrait d'améliorer considérablement la qualité de vie des patientes.

Par des comparaisons de différents groupes de tissus, il a été possible de représenter dans l'espace les différents groupes de tissus par PCA. Ces représentations nous ont permis d'observer des similitudes entre les tissus du cancer de l'ovaire et les tissus mullériens associés. L'identification des protéines étant difficile sur coupes de tissu, des analyses en LC-MS ont été réalisées sur des extraits de ces différentes régions d'intérêt. Le nombre des protéines identifiées a pu être comparé et a révélé que plus de protéines était retrouvées en commun entre les tissus ovariens et tubaires pour les cas séreux qu'avec les autres types de tissus. Un profil moléculaire commun existe donc entre les tissus de cancer de l'ovaire séreux et les tissus tubaires. Ces analyses viennent en support de la théorie d'origine ectopique du cancer de l'ovaire.

Au cours de ces différents travaux, différentes approches ont été utilisées pour l'identification des protéines dans les tissus de cancer de l'ovaire. Certaines de ces protéines correspondent à des biomarqueurs des cancers de l'ovaire épithéliaux déjà identifiés par divers groupes et d'autres ont été nouvellement découverts.

Parmi les protéines trouvées dans les analyses bottom up, mucin-9 a été identifiée spécifiquement dans les zones cancéreuses des biopsies. Cette protéine est une glycoprotéine qui sert de récepteur cellulaire à des stimuli externes pour une réponse cellulaire de prolifération et de progression cellulaire. Comme les autres glycoprotéines, ce marqueur pourrait également servir à l'adhésion des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales via les sélectines lors du processus d'extravasation pour la migration métastatique. De nombreuses protéines d'interaction du cytosquelette avec la matrice extra cellulaire sont également trouvées, telles que profilin 1, cofilin-1, vimentin et cytokeratin 19, révélant des phénomènes de remaniements morphologiques de la cellule pour sa migration métastatique.

Dans les analyses en top down des protéines séparées par gel 2D, l'annexin A2 a pu être identifiée, portant cette même fonction ainsi que les fonctions d'activation de la migration, la prolifération et adhésion cellulaire. D'autres protéines reportées dans le tableau 3 portent les fonctions de transport lipidique, de régulation du pH, de communication intercellulaire, stockage du fer, chaperonne.

Certaines de ces fonctions peuvent être considérée comme universelles aux caractéristiques biologiques portées par toute cellule cancéreuse. L'apparition de ces caractères est bien évidemment régie par d'autres acteurs moléculaires qui n'ont pas été répertoriés dans ces analyses.

Parmi ces protéines, nombre ne sont actives que lorsqu'elles sont maturées par d'autres protéines, les protéases. On compte plus de 200 types de protéases, dont les proprotéines convertases font partie des plus influentes. Elles permettent la maturation de protéines impliquées dans de multiples processus physiopathologiques dont fait partie le cancer, comme décrit dans le chapitre 1.

C'est pour cela qu'une partie du projet a été axée sur l'étude de l'implication des proprotéines convertases dans les phénomènes de cancérisation de l'ovaire. J'ai alors pu cibler celles qui semblaient impliquées dans le cancer de l'ovaire et créer des lignées knock down qui permettraient de vérifier si l'absence de telle ou telle PC permettait d'atténuer les

caractères cancéreux de la cellule. Les lignées une fois créées grâce à la technologie des shRNA ont alors été testées *in vitro* et *in vivo* pour diverses caractéristiques. Les lignées shPACE4 et shPC7 ont dans un premier temps montré une baisse de leur prolifération et de leur clonogénicité. Ces lignées ont donc alors été sélectionnées pour effectuer des tests *in vivo*. Ceux-ci m'ont permis de valider que la lignée shPC7 permettait une croissance plus rapide des tumeurs par rapport à cette même lignée contrôle. Cependant, la lignée cellulaire SKOV3 shPACE4 provoquait également une croissance ralentie *in vivo* par rapport à la lignée contrôle « Non Target », prouvant l'importance de cet enzyme dans le cancer de l'ovaire, au même titre que dans le cancer de la prostate.

Les expériences réalisées sur les PC dans le cancer de l'ovaire ouvrent des perspectives sur des expériences de recherche de biomarqueurs associés à l'action des différentes PC. D'une manière plus large, il serait possible de combiner les champs d'investigation en biologie fondamentale, les approches de protéomique pour la recherche de biomarqueurs et les essais cliniques en pharmacologie.

Tous ces travaux prouvent l'importance d'utiliser les différentes déclinaisons des méthodes de protéomique pour des applications de recherche de biomarqueurs. Le développement des toutes dernières technologies permet à ce jour d'accéder à une sensibilité extrême pour la détection d'infimes variations du protéome entre des échantillons de divers types. Associé aux approches de découvertes de biomarqueurs en contexte anatomique, il sera bientôt possible, avec l'utilisation de la technologie LESA développée par Advion (304) (**figure 74**), d'accéder à une information riche au sein de région d'intérêt de tissus. Il sera alors possible d'explorer en profondeur la complexité des mécanismes sous jacents à des observations morphologiques d'altération des tissus. Ces stratégies pourront alors être intégrées à tous types d'applications en recherche fondamentale de l'implication de protéines dans un type de pathologie donné. Il est fort à parier que la réussite de cette stratégie puisse révolutionner la perception de l'ensemble de la communauté scientifique sur l'utilité de ces méthodes analytiques pour répondre à de nombreux questionnements sur la nature moléculaire d'événements physiopathologiques.



Figure 74 : Instrumentation Triversa Nanomate d'Advion permettant le LESA

Bibliographie

1. Lindert AC, Barents JW, Pinedo HM. [The silent killer: treatment of a patient by the oncological team]. *Ned Tijdschr Geneesk* 1978; 122: 65-8.
2. Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. Rapport technique. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2011. 78 p. Disponible sur www.invs.sante.fr
3. Hill C, Doyon F, Mousannif A. Evolution de la mortalité par cancer en France entre 1950 et 2006. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire, mai 2009, 272p. Disponible sur www.invs.sante.fr
4. Tretarre B, Remontet L, Menegoz F, et al. [Ovarian cancer: incidence and mortality in France]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2005; 34: 154-61.
5. Callahan MJ, Crum CP, Medeiros F, et al. Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3985-90.
6. Kurman RJ, Shih Ie M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*; 34: 433-43.
7. Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA. Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2604-12.
8. Conrads TP, Fusaro VA, Ross S, et al. High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 163-78.
9. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-7.
10. Zhu Y, Wu R, Sangha N, et al. Classifications of ovarian cancer tissues by proteomic patterns. *Proteomics* 2006; 6: 5846-56.
11. Lalwani N, Prasad SR, Vikram R, Shanbhogue AK, Huettner PC, Fasih N. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics*; 31: 625-46.
12. Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, et al. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell* 2004; 5: 19-24.
13. Vinatier D, Houfflin V, Collinet P. [Tumor markers and ovarian cysts]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2001; 30: S34-40.
14. Stevens EV, Liotta LA, Kohn EC. Proteomic analysis for early detection of ovarian cancer: a realistic approach? *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13 Suppl 2: 133-9.
15. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1054-61.
16. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 845-56.
17. Anderson K, Jacobson JS, Heitjan DF, et al. Cost-effectiveness of preventive strategies for women with a BRCA1 or a BRCA2 mutation. *Ann Intern Med* 2006; 144: 397-406.
18. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* 2001; 276: 27371-5.
19. Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 2006; 7: 599-604.
20. Riedinger JM, Bonnetain F, Basuyau JP, et al. Change in CA 125 levels after the first cycle of induction chemotherapy is an independent predictor of epithelial ovarian tumour outcome. *Ann Oncol* 2007; 18: 881-5.

21. Santillan A, Garg R, Zahurak ML, et al. Risk of epithelial ovarian cancer recurrence in patients with rising serum CA-125 levels within the normal range. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9338-43.
22. Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15 Suppl 3: 274-81.
23. Bast RC, Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol* 2003; 21: 200s-5s.
24. Buys SS, Partridge E, Greene MH, et al. Ovarian cancer screening in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening trial: findings from the initial screen of a randomized trial. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1630-9.
25. Robertson DM, Burger HG, Fuller PJ. Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 35-49.
26. Robertson DM, Cahir N, Burger HG, et al. Combined inhibin and CA125 assays in the detection of ovarian cancer. *Clin Chem* 1999; 45: 651-8.
27. Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, et al. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 447-53.
28. Huang CY, Cheng WF, Lee CN, et al. Serum mesothelin in epithelial ovarian carcinoma: a new screening marker and prognostic factor. *Anticancer Res* 2006; 26: 4721-8.
29. Kim DJ, Chan KS, Sano S, Digiovanni J. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in epithelial carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2007; 46: 725-31.
30. Rosen DG, Mercado-Uribe I, Yang G, et al. The role of constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian tumorigenesis and prognosis. *Cancer* 2006; 107: 2730-40.
31. Coon M, Ball A, Pound J, et al. Inhibition of lysophosphatidic acid acyltransferase beta disrupts proliferative and survival signals in normal cells and induces apoptosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1067-78.
32. Diefenbach CS, Soslow RA, Iasonos A, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase-beta (LPAAT-beta) is highly expressed in advanced ovarian cancer and is associated with aggressive histology and poor survival. *Cancer* 2006; 107: 1511-9.
33. Shigemasa K, Tian X, Gu L, et al. Human kallikrein 8 (hK8/TADG-14) expression is associated with an early clinical stage and favorable prognosis in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; 11: 1153-9.
34. Borgono CA, Kishi T, Scorilas A, et al. Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1487-93.
35. Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 1: S23-9.
36. Ahmed AS, Dew T, Lawton FG, et al. M2-PK as a novel marker in ovarian cancer. A prospective cohort study. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28: 83-8.
37. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6379-83.
38. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, et al. c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res* 2007; 67: 1670-9.
39. Overall CM, Kleinfeld O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 227-39.
40. Kamat AA, Fletcher M, Gruman LM, et al. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1707-14.

41. Thaker PH, Deavers M, Celestino J, et al. EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5145-50.
42. Rodabaugh KJ, Mhawech-Fauceglia P, Groth J, Lele S, Sood AK. Prostate-derived Ets factor is overexpressed in serous epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26: 10-5.
43. Ripley D, Shoup B, Majewski A, Chegini N. Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 761-8.
44. Agarwal R, Whang DH, Alvero AB, et al. Macrophage migration inhibitory factor expression in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 348 e1-5.
45. Lim R, Ahmed N, Borregaard N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition. *Int J Cancer* 2007; 120: 2426-34.
46. Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, et al. CD46 expression is indicative of shorter revival-free survival for ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 2006; 26: 4943-8.
47. Zhang Z, Barnhill SD, Zhang H, et al. Combination of multiple serum markers using an artificial neural network to improve specificity in discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 56-61.
48. Visintin I, Feng Z, Longton G, et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1065-72.
49. Moore RG, Maclaughlan S. Current clinical use of biomarkers for epithelial ovarian cancer. *Curr Opin Oncol*; 22: 492-7.
50. Vermillion. Ova-1 Helping Guide Surgical Decisions, 2010, <http://www.ova-1.com/>
51. Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 3695-700.
52. Yurkovetsky Z, Skates S, Lomakin A, et al. Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer. *J Clin Oncol*; 28: 2159-66.
53. Scholler N, Crawford M, Sato A, et al. Bead-based ELISA for validation of ovarian cancer early detection markers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2117-24.
54. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 657-62.
55. Abbott RT, Tripp S, Perkins SL, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS. Analysis of the PI-3-Kinase-PTEN-AKT pathway in human lymphoma and leukemia using a cell line microarray. *Mod Pathol* 2003; 16: 607-12.
56. Mor G, Visintin I, Lai Y, et al. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 7677-82.
57. Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol* 2005; 563: 23-60.
58. Anderson L, Hunter CL. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 573-88.
59. Narasimhan K, Changqing Z, Choolani M. Ovarian cancer proteomics: Many technologies one goal. *Proteomics Clin Appl* 2008; 2: 195-218.
60. Wulfschuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 267-75.
61. Somiari RI, Somiari S, Russell S, Shriver CD. Proteomics of breast carcinoma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 815: 215-25.
62. Posadas EM, Simpkins F, Liotta LA, MacDonald C, Kohn EC. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer--realistic hope? *Ann Oncol* 2005; 16: 16-22.

63. Wein J. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in sigmoid gradients. *Anal Biochem* 1969; 31: 405-11.
64. Bagdasarian A, Wheeler J, Stewart GJ, Ahmed SS, Colman RW. Isolation of alpha 1-protease inhibitor from human normal and malignant ovarian tissue. *J Clin Invest* 1981; 67: 281-91.
65. Chen R, Pan S, Brentnall TA, Aebersold R. Proteomic profiling of pancreatic cancer for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 523-33.
66. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001.
67. Banks RE, Dunn MJ, Forbes MA, et al. The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis--preliminary findings. *Electrophoresis* 1999; 20: 689-700.
68. Craven RA, Totty N, Harnden P, Selby PJ, Banks RE. Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *Am J Pathol* 2002; 160: 815-22.
69. Wright GL, Jr. Two-dimensional acrylamide gel electrophoresis of cancer-patient serum proteins. *Ann Clin Lab Sci* 1974; 4: 281-93.
70. Jones MB, Krutzsch H, Shu H, et al. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2002; 2: 76-84.
71. Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 24-30.
72. Petricoin EF, Ornstein DK, Liotta LA. Clinical proteomics: Applications for prostate cancer biomarker discovery and detection. *Urol Oncol* 2004; 22: 322-8.
73. Bons JA, Wodzig WK, van Diejen-Visser MP. Protein profiling as a diagnostic tool in clinical chemistry: a review. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1281-90.
74. Radulovic D, Jelveh S, Ryu S, et al. Informatics platform for global proteomic profiling and biomarker discovery using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 984-97.
75. Nelson RW, Krone JR, Bieber AL, Williams P. Mass spectrometric immunoassay. *Anal Chem* 1995; 67: 1153-8.
76. Denkert C, Budczies J, Kind T, et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer Res* 2006; 66: 10795-804.
77. Song J, Patel M, Rosenzweig CN, et al. Quantification of fragments of human serum inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 by a surface-enhanced laser desorption/ionization-based immunoassay. *Clin Chem* 2006; 52: 1045-53.
78. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 587-92.
79. Poon TC. Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 51-65.
80. Gericke B, Raila J, Sehoul J, et al. Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 2005; 5: 133.
81. Wright GL, Jr. SELDI proteinchip MS: a platform for biomarker discovery and cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2: 549-63.
82. Xiao Z, Adam BL, Cazares LH, et al. Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease. *Cancer Res* 2001; 61: 6029-33.
83. Wang H, Kachman MT, Schwartz DR, Cho KR, Lubman DM. Comprehensive proteome analysis of ovarian cancers using liquid phase separation, mass mapping and

tandem mass spectrometry: a strategy for identification of candidate cancer biomarkers. *Proteomics* 2004; 4: 2476-95.

84. Fuller AP, Palmer-Toy D, Erlander MG, Sgroi DC. Laser capture microdissection and advanced molecular analysis of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 335-45.

85. Ramus C, Gonzalez de Peredo A, Dahout C, Gallagher M, Garin J. An optimized strategy for ICAT quantification of membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 68-78.

86. Ong SE, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* 2006; 1: 2650-60.

87. Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P, Wisniewski JR, Mann M. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat Methods*; 7: 383-5.

88. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60: 2299-301.

89. An HJ, Miyamoto S, Lancaster KS, et al. Profiling of glycans in serum for the discovery of potential biomarkers for ovarian cancer. *J Proteome Res* 2006; 5: 1626-35.

90. McDonnell LA, Heeren RM. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2007; 26: 606-43.

91. Li KW, van Golen FA, van Minnen J, van Veelen PA, van der Greef J, Geraerts WP. Structural identification, neuronal synthesis, and role in male copulation of myomodulin-A of *Lymnaea*: a study involving direct peptide profiling of nervous tissue by mass spectrometry. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 25: 355-8.

92. Garden RW, Moroz LL, Moroz TP, Shippy SA, Sweedler JV. Excess salt removal with matrix rinsing: direct peptide profiling of neurons from marine invertebrates using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1996; 31: 1126-30.

93. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997; 69: 4751-60.

94. Franck J, Longuespee R, Wisztorski M, et al. MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. *Med Sci Monit*; 16: BR293-9.

95. Bonnel D, Longuespee R, Franck J, et al. Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer. *Anal Bioanal Chem*; 401: 149-65.

96. Chaurand P, Latham JC, Lane KB, et al. Imaging mass spectrometry of intact proteins from alcohol-preserved tissue specimens: bypassing formalin fixation. *J Proteome Res* 2008; 7: 3543-55.

97. Mange A, Chaurand P, Perrochia H, Roger P, Caprioli RM, Solassol J. Liquid chromatography-tandem and MALDI imaging mass spectrometry analyses of RCL2/CS100-fixed, paraffin-embedded tissues: proteomics evaluation of an alternate fixative for biomarker discovery. *J Proteome Res* 2009; 8: 5619-28.

98. Ergin B, Meding S, Langer R, et al. Proteomic analysis of PAXgene-fixed tissues. *J Proteome Res*; 9: 5188-96.

99. Lemaire R, Wisztorski M, Desmons A, et al. MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem* 2006; 78: 7145-53.

100. Seeley EH, Oppenheimer SR, Mi D, Chaurand P, Caprioli RM. Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008; 19: 1069-77.

101. Leinweber BD, Tsaprailis G, Monks TJ, Lau SS. Improved MALDI-TOF imaging yields increased protein signals at high molecular mass. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009; 20: 89-95.

102. Djidja MC, Francese S, Loadman PM, et al. Detergent addition to tryptic digests and ion mobility separation prior to MS/MS improves peptide yield and protein identification for in situ proteomic investigation of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinoma tissue sections. *Proteomics* 2009; 9: 2750-63.
103. Sibony M, Commo F, Callard P, Gasc JM. Enhancement of mRNA in situ hybridization signal by microwave heating. *Lab Invest* 1995; 73: 586-91.
104. Evers P, Uylings HB. Effects of microwave pretreatment on immunocytochemical staining of vibratome sections and tissue blocks of human cerebral cortex stored in formaldehyde fixative for long periods. *J Neurosci Methods* 1994; 55: 163-72.
105. Evers P, Uylings HB. Microwave-stimulated antigen retrieval is pH and temperature dependent. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1555-63.
106. Shiurba RA, Spooner ET, Ishiguro K, et al. Immunocytochemistry of formalin-fixed human brain tissues: microwave irradiation of free-floating sections. *Brain Res Brain Res Protoc* 1998; 2: 109-19.
107. Rodriguez-Rigueiro T, Valladares-Ayerbes M, Haz-Conde M, et al. A novel procedure for protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Proteomics*; 11: 2555-9.
108. Shi SR, Cote C, Kalra KL, Taylor CR, Tandon AK. A technique for retrieving antigens in formalin-fixed, routinely acid-decalcified, celloidin-embedded human temporal bone sections for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 787-92.
109. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry used for routinely processed celloidin-embedded human temporal bone sections: standardization and development. *Auris Nasus Larynx* 1998; 25: 425-43.
110. Groseclose MR, Massion PP, Chaurand P, Caprioli RM. High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. *Proteomics* 2008; 8: 3715-24.
111. Gustafsson JO, Oehler MK, McColl SR, Hoffmann P. Citric acid antigen retrieval (CAAR) for tryptic peptide imaging directly on archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Proteome Res*; 9: 4315-28.
112. Kelleher NL. Top-down proteomics. *Anal Chem* 2004; 76: 197A-203A.
113. Lemaire R, Tabet JC, Ducoroy P, Hendra JB, Salzet M, Fournier I. Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* 2006; 78: 809-19.
114. Meriaux C, Franck J, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I. Liquid ionic matrixes for MALDI mass spectrometry imaging of lipids. *J Proteomics*; 73: 1204-18.
115. Spraggins JM, Caprioli RM. High-speed MALDI-TOF imaging mass spectrometry: rapid ion image acquisition and considerations for next generation instrumentation. *J Am Soc Mass Spectrom*; 22: 1022-31.
116. Gustafsson JO, Oehler MK, Ruskiewicz A, McColl SR, Hoffmann P. MALDI Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS)-Application of Spatial Proteomics for Ovarian Cancer Classification and Diagnosis. *Int J Mol Sci*; 12: 773-94.
117. <http://www.maldi-msi.org>
118. Schwamborn K, Krieg RC, Reska M, Jakse G, Knuechel R, Wellmann A. Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging. *Int J Mol Med* 2007; 20: 155-9.
119. Balluff B, Elsner M, Kowarsch A, et al. Classification of HER2/neu status in gastric cancer using a breast-cancer derived proteome classifier. *J Proteome Res*; 9: 6317-22.
120. Rauser S, Marquardt C, Balluff B, et al. Classification of HER2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry. *J Proteome Res*; 9: 1854-63.
121. Oppenheimer SR, Mi D, Sanders ME, Caprioli RM. Molecular analysis of tumor margins by MALDI mass spectrometry in renal carcinoma. *J Proteome Res*; 9: 2182-90.

122. Hervouet E, Demont J, Pecina P, et al. A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 531-9.
123. Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, et al. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 759-68.
124. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* 2001; 7: 493-6.
125. Agar NY, Malcolm JG, Mohan V, et al. Imaging of meningioma progression by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*; 82: 2621-5.
126. Schwartz SA, Weil RJ, Thompson RC, et al. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Cancer Res* 2005; 65: 7674-81.
127. Chaurand P, Schwartz SA, Caprioli RM. Assessing protein patterns in disease using imaging mass spectrometry. *J Proteome Res* 2004; 3: 245-52.
128. Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM. Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am J Pathol* 2004; 165: 1057-68.
129. Andersson M, Groseclose MR, Deutch AY, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry of proteins and peptides: 3D volume reconstruction. *Nat Methods* 2008; 5: 101-8.
130. Sinha TK, Khatib-Shahidi S, Yankeelov TE, et al. Integrating spatially resolved three-dimensional MALDI IMS with in vivo magnetic resonance imaging. *Nat Methods* 2008; 5: 57-9.
131. Seeley EH, Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 18126-31.
132. Seeley EH, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: Towards clinical diagnostics. *Proteomics Clin Appl* 2008; 2: 1435-43.
133. Ronci M, Bonanno E, Colantoni A, et al. Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to MALDI-TOF imaging MS investigations. *Proteomics* 2008; 8: 3702-14.
134. Seuma J, Bunch J, Cox A, McLeod C, Bell J, Murray C. Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers. *Proteomics* 2008; 8: 3775-84.
135. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2003; 362: 433-9.
136. Cazares LH, Troyer D, Mendrinos S, et al. Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5541-51.
137. Djidja MC, Claude E, Snel MF, et al. Novel molecular tumour classification using MALDI-mass spectrometry imaging of tissue micro-array. *Anal Bioanal Chem*; 397: 587-601.
138. Pevsner PH, Melamed J, Remsen T, et al. Mass spectrometry MALDI imaging of colon cancer biomarkers: a new diagnostic paradigm. *Biomark Med* 2009; 3: 55-69.
139. Jones EA, van Remoortere A, van Zeijl RJ, et al. Multiple statistical analysis techniques corroborate intratumor heterogeneity in imaging mass spectrometry datasets of myxofibrosarcoma. *PLoS One*; 6: e24913.

140. Deininger SO, Ebert MP, Futterer A, Gerhard M, Rocken C. MALDI imaging combined with hierarchical clustering as a new tool for the interpretation of complex human cancers. *J Proteome Res* 2008; 7: 5230-6.
141. Lemaire R, Menguellet SA, Stauber J, et al. Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *J Proteome Res* 2007; 6: 4127-34.
142. Yang Y, Fruh K, Ahn K, Peterson PA. In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem* 1995; 270: 27687-94.
143. Longuespee R, Boyon C, Desmons A, et al. Ovarian cancer molecular pathology. *Cancer Metastasis Rev*.
144. Fugere M, Day R. Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 294-301.
145. <http://merops.sanger.ac.uk/>
146. Couture F, D'Anjou F, Day R. On the cutting edge of proprotein convertase pharmacology: from molecular concepts to clinical applications. *Biomol Concepts*; 2: 421-38.
147. Takumi I, Steiner DF, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY. Localization of prohormone convertases 1/3 and 2 in the human pituitary gland and pituitary adenomas: analysis by immunohistochemistry, immunoelectron microscopy, and laser scanning microscopy. *Mod Pathol* 1998; 11: 232-8.
148. Jin L, Kulig E, Qian X, et al. Distribution and regulation of proconvertases PC1 and PC2 in human pituitary adenomas. *Pituitary* 1999; 1: 187-95.
149. Kajiwara H, Itoh Y, Itoh J, Yasuda M, Osamura RY. Immunohistochemical expressions of prohormone convertase (PC)1/3 and PC2 in carcinoids of various organs. *Tokai J Exp Clin Med* 1999; 24: 13-20.
150. Cheng M, Watson PH, Paterson JA, Seidah N, Chretien M, Shiu RP. Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer* 1997; 71: 966-71.
151. Bassi DE, Mahloogi H, Al-Saleem L, Lopez De Cicco R, Ridge JA, Klein-Szanto AJ. Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog* 2001; 31: 224-32.
152. D'Anjou F, Routhier S, Perreault JP, et al. Molecular Validation of PACE4 as a Target in Prostate Cancer. *Transl Oncol*; 4: 157-72.
153. Rovere C, Barbero P, Maoret JJ, Laburthe M, Kitabgi P. Pro-neurotensin/neuromedin N expression and processing in human colon cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 155-9.
154. Page RE, Klein-Szanto AJ, Litwin S, et al. Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. *Cell Oncol* 2007; 29: 289-99.
155. Artenstein AW, Opal SM. Proprotein convertases in health and disease. *N Engl J Med*; 365: 2507-18.
156. Khatib AM, Siegfried G, Chretien M, Metrakos P, Seidah NG. Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol* 2002; 160: 1921-35.
157. Santavicca M, Noel A, Angliker H, et al. Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 activation by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases. *Biochem J* 1996; 315 (Pt 3): 953-8.
158. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995; 375: 244-7.
159. Sardinha TC, Noguerras JJ, Xiong H, Weiss EG, Wexner SD, Abramson S. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase mRNA expression in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 389-95.

160. Nabeshima K, Inoue T, Shima Y, et al. Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Cancer Res* 2000; 60: 3364-9.
161. Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH, Volk B. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Am J Pathol* 1998; 153: 429-37.
162. Yana I, Weiss SJ. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 2387-401.
163. Murakami K, Sakukawa R, Ikeda T, et al. Invasiveness of hepatocellular carcinoma cell lines: contribution of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Neoplasia* 1999; 1: 424-30.
164. Schlondorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 21): 3603-17.
165. Lunn CA, Fan X, Dalie B, et al. Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. *FEBS Lett* 1997; 400: 333-5.
166. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 556-62.
167. McCulloch DR, Akl P, Samarasinghe H, Herington AC, Odorico DM. Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 314-23.
168. Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol* 1999; 154: 1489-501.
169. Tortorella M, Pratta M, Liu RQ, et al. The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* 2000; 275: 25791-7.
170. Abbaszade I, Liu RQ, Yang F, et al. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* 1999; 274: 23443-50.
171. Matthews RT, Gary SC, Zerillo C, et al. Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *J Biol Chem* 2000; 275: 22695-703.
172. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 827-72.
173. Mantovani A, Garlanda C, Intra M, Vecchi A. Regulation of endothelial cell function by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Transplant Proc* 1998; 30: 4239-43.
174. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990; 50: 537-44.
175. Balaram SK, Agrawal DK, Edwards JD. Insulin like growth factor-1 activates nuclear factor-kappaB and increases transcription of the intercellular adhesion molecule-1 gene in endothelial cells. *Cardiovasc Surg* 1999; 7: 91-7.
176. Ishizuka T, Takamizawa-Matsumoto M, Suzuki K, Kurita A. Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alpha-stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1999; 369: 237-45.
177. Hayasaki Y, Nakajima M, Kitano Y, Iwasaki T, Shimamura T, Iwaki K. ICAM-1 expression on cardiac myocytes and aortic endothelial cells via their specific endothelin receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 817-24.

178. McCarron RM, Wang L, Stanimirovic DB, Spatz M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 1993; 156: 31-4.
179. Morisaki N, Takahashi K, Shiina R, et al. Platelet-derived growth factor is a potent stimulator of expression of intercellular adhesion molecule-1 in human arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 612-8.
180. Zetter BR. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 219-29.
181. Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; 68: 4-17.
182. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 283-323.
183. Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 120: 577-85.
184. Hempstead BL, Birge RB, Fajardo JE, et al. Expression of the v-crck oncogene product in PC12 cells results in rapid differentiation by both nerve growth factor- and epidermal growth factor-dependent pathways. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1964-71.
185. Daemi N, Thomasset N, Lissitzky JC, et al. Anti-beta4 integrin antibodies enhance migratory and invasive abilities of human colon adenocarcinoma cells and their MMP-2 expression. *Int J Cancer* 2000; 85: 850-6.
186. Khatib AM, Nip J, Fallavollita L, Lehmann M, Jensen G, Brodt P. Regulation of urokinase plasminogen activator/plasmin-mediated invasion of melanoma cells by the integrin vitronectin receptor alphaVbeta3. *Int J Cancer* 2001; 91: 300-8.
187. Izumi Y, Taniuchi Y, Tsuji T, et al. Characterization of human colon carcinoma variant cells selected for sialyl Lex carbohydrate antigen: liver colonization and adhesion to vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 1995; 216: 215-21.
188. Tozeren A, Kleinman HK, Grant DS, Morales D, Mercurio AM, Byers SW. E-selectin-mediated dynamic interactions of breast- and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int J Cancer* 1995; 60: 426-31.
189. Nelson RM, Dolich S, Aruffo A, Cecconi O, Bevilacqua MP. Higher-affinity oligosaccharide ligands for E-selectin. *J Clin Invest* 1993; 91: 1157-66.
190. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, et al. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992; 69: 927-38.
191. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246: 603-8.
192. Baserga R, Rubin R. Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993; 3: 47-61.
193. Rodrigues GA, Park M. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 15-24.
194. Kimura I, Honda R, Okai H, Okabe M. Vascular endothelial growth factor promotes cell-cycle transition from G0 to G1 phase in subcultured endothelial cells of diabetic rat thoracic aorta. *Jpn J Pharmacol* 2000; 83: 47-55.
195. Duguay SJ, Lai-Zhang J, Steiner DF. Mutational analysis of the insulin-like growth factor I prohormone processing site. *J Biol Chem* 1995; 270: 17566-74.
196. Denault JB, Claing A, D'Orleans-Juste P, et al. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* 1995; 362: 276-80.
197. Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, et al. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* 1990; 111: 2851-9.

198. Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, et al. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 1996; 314 (Pt 3): 951-60.
199. Hendy GN, Bennett HP, Gibbs BF, Lazure C, Day R, Seidah NG. Parathyroid hormone is preferentially cleaved to parathyroid hormone by the prohormone convertase furin. A mass spectrometric study. *J Biol Chem* 1995; 270: 9517-25.
200. Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 443-78.
201. Fu Y, Campbell EJ, Shepherd TG, Nachtigal MW. Epigenetic regulation of proprotein convertase PACE4 gene expression in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 569-76.
202. Thibault DB, Gillam CJ, Grey AC, Han J, Schey KL. MALDI tissue profiling of integral membrane proteins from ocular tissues. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008; 19: 814-22.
203. Leinweber BD, Tsaprailis G, Monks TJ, Lau SS. Improved MALDI-TOF Imaging Yields Increased Protein Signals at High Molecular Mass. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008.
204. van Remoortere A, van Zeijl RJ, van den Oever N, et al. MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue. *J Am Soc Mass Spectrom*; 21: 1922-9.
205. Beavis RC, Chait BT. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1989; 3: 432-5.
206. Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J Mass Spectrom* 2003; 38: 699-708.
207. Zangi R, Zhou R, Berne BJ. Urea's action on hydrophobic interactions. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 1535-41.
208. Herskovits TT, Gadegbeku B, Jaillet H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. *J Biol Chem* 1970; 245: 2588-98.
209. Luxembourg SL, McDonnell LA, Duursma MC, Guo X, Heeren RM. Effect of local matrix crystal variations in matrix-assisted ionization techniques for mass spectrometry. *Anal Chem* 2003; 75: 2333-41.
210. Thompson MR, Chourey K, Froelich JM, Erickson BK, VerBerkmoes NC, Hettich RL. Experimental approach for deep proteome measurements from small-scale microbial biomass samples. *Anal Chem* 2008; 80: 9517-25.
211. Wang H, Qian WJ, Mottaz HM, et al. Development and evaluation of a micro- and nanoscale proteomic sample preparation method. *J Proteome Res* 2005; 4: 2397-403.
212. Ferro M, Seigneurin-Berny D, Rolland N, et al. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* 2000; 21: 3517-26.
213. Zhang H, Lin Q, Ponnusamy S, et al. Differential recovery of membrane proteins after extraction by aqueous methanol and trifluoroethanol. *Proteomics* 2007; 7: 1654-63.
214. Wang W, Guo T, Rudnick PA, et al. Membrane proteome analysis of microdissected ovarian tumor tissues using capillary isoelectric focusing/reversed-phase liquid chromatography-tandem MS. *Anal Chem* 2007; 79: 1002-9.
215. Reiersen H, Rees AR. Trifluoroethanol may form a solvent matrix for assisted hydrophobic interactions between peptide side chains. *Protein Eng* 2000; 13: 739-43.
216. Jalili S, Akhavan M. Molecular dynamics simulation study of association in trifluoroethanol/water mixtures. *J Comput Chem* 2009.
217. Carrotta R, Manno M, Giordano FM, et al. Protein stability modulated by a conformational effector: effects of trifluoroethanol on bovine serum albumin. *Phys Chem Chem Phys* 2009; 11: 4007-18.

218. Redeby T, Emmer A. Membrane protein and peptide sample handling for MS analysis using a structured MALDI target. *Anal Bioanal Chem* 2005; 381: 225-32.
219. Grey AC, Chaurand P, Caprioli RM, Schey KL. MALDI Imaging Mass Spectrometry of Integral Membrane Proteins from Ocular Lens and Retinal Tissue (dagger). *J Proteome Res* 2009.
220. Berridge G, Chalk R, D'Avanzo N, et al. High-performance liquid chromatography separation and intact mass analysis of detergent-solubilized integral membrane proteins. *Anal Biochem*; 410: 272-80.
221. Gorka J, Rohmer M, Bornemann S, et al. Perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography for protein separation from detergent-containing solutions: an alternative to gel-based approaches. *Anal Biochem*; 424: 97-107.
222. Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389: 1033-45.
223. Lokman NA, Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenviron*; 4: 199-208.
224. Gagne JP, Ethier C, Gagne P, et al. Comparative proteome analysis of human epithelial ovarian cancer. *Proteome Sci* 2007; 5: 16.
225. Tchagang AB, Tewfik AH, DeRycke MS, Skubitz KM, Skubitz AP. Early detection of ovarian cancer using group biomarkers. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 27-37.
226. Gunawardana CG, Kuk C, Smith CR, Batruch I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Comprehensive analysis of conditioned media from ovarian cancer cell lines identifies novel candidate markers of epithelial ovarian cancer. *J Proteome Res* 2009; 8: 4705-13.
227. Faca VM, Ventura AP, Fitzgibbon MP, et al. Proteomic analysis of ovarian cancer cells reveals dynamic processes of protein secretion and shedding of extra-cellular domains. *PLoS One* 2008; 3: e2425.
228. Ween MP, Lokman NA, Hoffmann P, Rodgers RJ, Ricciardelli C, Oehler MK. Transforming growth factor-beta-induced protein secreted by peritoneal cells increases the metastatic potential of ovarian cancer cells. *Int J Cancer*; 128: 1570-84.
229. Lim R, Lappas M, Ahmed N, Permezel M, Quinn MA, Rice GE. 2D-PAGE of ovarian cancer: analysis of soluble and insoluble fractions using medium-range immobilized pH gradients. *Biochem Biophys Res Commun*; 406: 408-13.
230. Kozak KR, Su F, Whitelegge JP, Faull K, Reddy S, Farias-Eisner R. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 2005; 5: 4589-96.
231. Hogdall C, Fung ET, Christensen IJ, et al. A novel proteomic biomarker panel as a diagnostic tool for patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*; 123: 308-13.
232. Amonkar SD, Bertenshaw GP, Chen TH, et al. Development and preliminary evaluation of a multivariate index assay for ovarian cancer. *PLoS One* 2009; 4: e4599.
233. Moore LE, Pfeiffer RM, Zhang Z, Lu KH, Fung ET, Bast RC, Jr. Proteomic biomarkers in combination with CA 125 for detection of epithelial ovarian cancer using prediagnostic serum samples from the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Cancer*; 118: 91-100.
234. Zhang Z, Bast RC, Jr., Yu Y, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5882-90.
235. Su F, Lang J, Kumar A, et al. Validation of candidate serum ovarian cancer biomarkers for early detection. *Biomark Insights* 2007; 2: 369-75.
236. Hynninen P, Vaskivuo L, Saarnio J, et al. Expression of transmembrane carbonic anhydrases IX and XII in ovarian tumours. *Histopathology* 2006; 49: 594-602.
237. Choschzick M, Oosterwijk E, Muller V, et al. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian cancer. *Virchows Arch*; 459: 193-200.

238. Woelber L, Mueller V, Eulenburg C, et al. Serum carbonic anhydrase IX during first-line therapy of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*; 117: 183-8.
239. Kucukgoz Gulec U, Paydas S, Guzel AB, Buyukkurt S, Seydaoglu G, Vardar MA. Comparative analysis of CA 125, ferritin, beta-2 microglobulin, lactic dehydrogenase levels in serum and peritoneal fluid in patients with ovarian neoplasia. *Med Oncol*.
240. Tripathi PK, Chatterjee SK. Elevated expression of ferritin H-chain mRNA in metastatic ovarian tumor. *Cancer Invest* 1996; 14: 518-26.
241. Cross AJ, Sinha R, Wood RJ, et al. Iron homeostasis and distal colorectal adenoma risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Cancer Prev Res (Phila)*; 4: 1465-75.
242. Delie F, Petignat P, Cohen M. GRP78 Protein Expression in Ovarian Cancer Patients and Perspectives for a Drug-Targeting Approach. *J Oncol*; 2012: 468615.
243. Cohen M, Petignat P. Purified autoantibodies against glucose-regulated protein 78 (GRP78) promote apoptosis and decrease invasiveness of ovarian cancer cells. *Cancer Lett*; 309: 104-9.
244. Vidal CI, Mintz PJ, Lu K, et al. An HSP90-mimic peptide revealed by fingerprinting the pool of antibodies from ovarian cancer patients. *Oncogene* 2004; 23: 8859-67.
245. Elstrand MB, Stavnes HT, Trope CG, Davidson B. Heat shock protein 90 is a putative therapeutic target in patients with recurrent advanced-stage ovarian carcinoma with serous effusions. *Hum Pathol*; 43: 529-35.
246. Luo LY, Herrera I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library. *Br J Cancer* 2002; 87: 339-43.
247. Jiao Y, Ou W, Meng F, Zhou H, Wang A. Targeting HSP90 in ovarian cancers with multiple receptor tyrosine kinase coactivation. *Mol Cancer*; 10: 125.
248. Karpova MA, Moshkovskii SA, Toropygin IY, Archakov AI. Cancer-specific MALDI-TOF profiles of blood serum and plasma: biological meaning and perspectives. *J Proteomics*; 73: 537-51.
249. Lee EK, Han GY, Park HW, Song YJ, Kim CW. Transgelin promotes migration and invasion of cancer stem cells. *J Proteome Res*; 9: 5108-17.
250. Creekmore AL, Silkworth WT, Cimini D, Jensen RV, Roberts PC, Schmelz EM. Changes in gene expression and cellular architecture in an ovarian cancer progression model. *PLoS One*; 6: e17676.
251. <http://www.advion.com/biosystems/triversa-nanomate/LESA/>
252. Kuo KT, Guan B, Feng Y, et al. Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. *Cancer Res* 2009; 69: 4036-42.
253. Longuespee R, Boyon C, Castellier C, et al. The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling. *Histochem Cell Biol*; 138: 141-54.
254. Seeber LM, van Diest PJ. Epigenetics in ovarian cancer. *Methods Mol Biol*; 863: 253-69.
255. Krockenberger M, Honig A, Rieger L, et al. Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 101-6.
256. Karantanis D, Allen-Auerbach M, Czernin J. Relationship among glycolytic phenotype, grade, and histological subtype in ovarian carcinoma. *Clin Nucl Med*; 37: 49-53.
257. Grunewald TG, Kammerer U, Winkler C, et al. Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation. *Br J Cancer* 2007; 96: 296-305.

258. Ratner ES, Keane FK, Lindner R, et al. A KRAS variant is a biomarker of poor outcome, platinum chemotherapy resistance and a potential target for therapy in ovarian cancer. *Oncogene*.
259. Meunier L, Puiffe ML, Le Page C, et al. Effect of ovarian cancer ascites on cell migration and gene expression in an epithelial ovarian cancer in vitro model. *Transl Oncol*; 3: 230-8.
260. Judson PL, He X, Cance WG, Van Le L. Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1551-6.
261. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3291-310.
262. Xing H, Weng D, Chen G, et al. Activation of fibronectin/PI-3K/Akt2 leads to chemoresistance to docetaxel by regulating survivin protein expression in ovarian and breast cancer cells. *Cancer Lett* 2008; 261: 108-19.
263. Li DQ, Divijendra Natha Reddy S, Pakala SB, et al. MTA1 coregulator regulates p53 stability and function. *J Biol Chem* 2009; 284: 34545-52.
264. Lin SW, Ke FC, Hsiao PW, Lee PP, Lee MT, Hwang JJ. Critical involvement of ILK in TGFbeta1-stimulated invasion/migration of human ovarian cancer cells is associated with urokinase plasminogen activator system. *Exp Cell Res* 2007; 313: 602-13.
265. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res* 2002; 62: 5358-64.
266. Zhu M, Fejzo MS, Anderson L, et al. Periostin promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis. *Gynecol Oncol*; 119: 337-44.
267. Urtasun R, Lopategi A, George J, et al. Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin alpha(V)beta(3) engagement and PI3K/pAkt/NFkappaB signaling. *Hepatology*; 55: 594-608.
268. Song G, Cai QF, Mao YB, Ming YL, Bao SD, Ouyang GL. Osteopontin promotes ovarian cancer progression and cell survival and increases HIF-1alpha expression through the PI3-K/Akt pathway. *Cancer Sci* 2008; 99: 1901-7.
269. Kim K, Visintin I, Alvero AB, Mor G. Development and validation of a protein-based signature for the detection of ovarian cancer. *Clin Lab Med* 2009; 29: 47-55.
270. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*; 629: 141-58.
271. Wang Z, Rao DD, Senzer N, Nemunaitis J. RNA interference and cancer therapy. *Pharm Res*; 28: 2983-95.
272. Ramirez-Carvajal L, Long CR. Down-regulation of viral replication by lentiviral-mediated expression of short-hairpin RNAs against vesicular stomatitis virus ribonuclear complex genes. *Antiviral Res*.
273. Zhu K, Chen L, Han X, Wang J. Short hairpin RNA targeting Twist1 suppresses cell proliferation and improves chemosensitivity to cisplatin in HeLa human cervical cancer cells. *Oncol Rep*; 27: 1027-34.
274. Lan Y, Zhao K, He W, et al. Inhibition of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus replication by short hairpin RNAs targeting of the nucleocapsid gene in a porcine kidney cell line. *J Virol Methods*; 179: 414-8.
275. Yeh MH, Tsai TC, Kuo HP, et al. Lentiviral short hairpin RNA screen of human kinases and phosphatases to identify potential biomarkers in oral squamous cancer cells. *Int J Oncol*; 39: 1221-31.
276. Liu X, Huang H, Wang J, et al. Dendrimers-delivered short hairpin RNA targeting hTERT inhibits oral cancer cell growth in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*; 82: 17-23.

277. Ayuk MA, Suttiaprapa S, Rinaldi G, Mann VH, Lee CM, Brindley PJ. Schistosoma mansoni U6 gene promoter-driven short hairpin RNA induces RNA interference in human fibrosarcoma cells and schistosomules. *Int J Parasitol*; 41: 783-9.
278. Kim MS, Kim KH. Inhibition of viral hemorrhagic septicemia virus replication using a short hairpin RNA targeting the G gene. *Arch Virol*; 156: 457-64.
279. Pongratz C, Yazdanpanah B, Kashkar H, Lehmann MJ, Krausslich HG, Kronke M. Selection of potent non-toxic inhibitory sequences from a randomized HIV-1 specific lentiviral short hairpin RNA library. *PLoS One*; 5: e13172.
280. Esmaeili F, Bamdad T, Ghasemi S. Stable suppression of gene expression by short interfering RNAs targeted to promoter in a mouse embryonal carcinoma stem cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 46: 834-40.
281. Bai Z, Li L, Wang B, et al. Inhibition of human cytomegalovirus infection by IE86-specific short hairpin RNA-mediated RNA interference. *Biosci Biotechnol Biochem*; 74: 1368-72.
282. Becker T, Berliner AJ, Nitabach MN, Gan WB, Macagno ER. Target-induced neurogenesis in the leech CNS involves efferent projections to the target. *Development* 1995; 121: 359-69.
283. Hua J, Chen D, Fu H, et al. Short hairpin RNA-mediated inhibition of S100A4 promotes apoptosis and suppresses proliferation of BGC823 gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett*; 292: 41-7.
284. Kruhn A, Wang A, Fruehauf JH, Lage H. Delivery of short hairpin RNAs by transkingdom RNA interference modulates the classical ABCB1-mediated multidrug-resistant phenotype of cancer cells. *Cell Cycle* 2009; 8: 3349-54.
285. Senzer N, Barve M, Kuhn J, et al. Phase I trial of "bi-shRNAi(furin)/GMCSF DNA/autologous tumor cell" vaccine (FANG) in advanced cancer. *Mol Ther*; 20: 679-86.
286. F. D'Anjou, F. Couture, R. Desjardins and R. Day. Knockdown strategies for the study of proprotein convertases and proliferation in prostate cancer cells. *Methods Mol. Biol.*, 2012 (sous révision)
287. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986; 93: 157-65.
288. Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986; 17: 259-63.
289. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987; 56: 279-85.
290. Weichert H, Blechschmidt I, Schroder S, Ambrosius H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). *Allerg Immunol (Leipz)* 1991; 37: 139-44.
291. Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog PJ. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochem Int* 1992; 27: 501-10.
292. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J*; 45: 12-8.
293. Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol In Vitro*; 25: 2147-51.
294. Koban I, Matthes R, Hubner NO, et al. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*; 7: Doc06.

295. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 1991; 142: 257-65.
296. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006; 1: 2315-9.
297. McDonnell AC, Van Kirk EA, Isaak DD, Murdoch WJ. Effects of progesterone on ovarian tumorigenesis in xenografted mice. *Cancer Lett* 2005; 221: 49-53.
298. Ma L, Lai D, Liu T, Cheng W, Guo L. Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*; 42: 593-602.
299. Chan C, Scollard DA, McLarty K, Smith S, Reilly RM. A comparison of ¹¹¹In- or ⁶⁴Cu-DOTA-trastuzumab Fab fragments for imaging subcutaneous HER2-positive tumor xenografts in athymic mice using microSPECT/CT or microPET/CT. *EJNMMI Res*; 1: 15.
300. Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, et al. In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J Nucl Med* 2007; 48: 1313-9.
301. Kenny HA, Lengyel E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell Cycle* 2009; 8: 683-8.
302. Keyes KA, Mann L, Teicher B, Alvarez E. Site-dependent angiogenic cytokine production in human tumor xenografts. *Cytokine* 2003; 21: 98-104.
303. Xing J, Jia CR, Wang Y, Guo J, Cai Y. Effect of shRNA targeting survivin on ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*; 138: 1221-9.
304. <http://www.advion.com/biosystems/triversa-nanomate/LESA/>

Annexes

Article 1

Received: 2010.05.13
Accepted: 2010.06.15
Published: 2010.09.01

MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30 000 daltons

BR

Authors' Contribution:

- A** Study Design
- B** Data Collection
- C** Statistical Analysis
- D** Data Interpretation
- E** Manuscript Preparation
- F** Literature Search
- G** Funds Collection

Franck J*¹ (A,B,C,D,E,F), Longuespée R*¹ (A,B,C,D,E,F), Wisztorski M¹ (B), Van Remoortere A² (B), Van Zeijl R² (B), Deelder A² (B), Salzet M¹ (E,G), McDonnell L¹ (D,E,G), Fournier I¹ (A,D,E,G).

* first authors

¹ Université Nord de France, CNRS, MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives, Université Lille 1, Lille, France

² Biomolecular Mass Spectrometry Unit, Department of Parasitology, Leiden University Medical Centre, Leiden, Netherlands

Source of support: Supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Direction de la Politique Industrielle et Institut des Sciences de la Vie (to MS and IF), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to IF), Institut du Cancer (INCA to IF)

Background:

Summary

Since its introduction 10 years ago by Caprioli and associates, MALDI mass spectrometry imaging has enabled spatial analysis of drugs, lipids, peptides, and polypeptides. In polypeptides, the detectable mass range is limited to small proteins with a mass less than 25 kDa. This is a limitation, as many proteins, including cytokines, growth factors, enzymes, and receptors have molecular weights exceeding 25 kDa. In the present work, we report the development of a novel strategy to observe higher mass proteins up to 30 kDa.

Material/Methods:

We investigated the development of sample preparation methods based on hexafluoroisopropanol (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) and 2,2,2-trifluoroethanol solvents for protein solubilization optimized for high-mass proteins.

Results:

We were, for the first time in mass spectrometry imaging, able to detect to proteins up to 70 kDa directly from tissue. These developments indicate future avenues by which the sensitivity of protein mass spectrometry imaging can be further improved. We applied these developments to ovarian cancer and demonstrate that protein are similar to that which can be obtained using 2D gel based analyses.

Conclusions:

Increasing the possibility of detecting proteins and high-mass proteins is key for developing direct tissue proteomics and especially any potential functional investigation. These data will open the door of a novel step in mass spectrometry imaging.

key words:

MALDI MS imaging • high masses • proteins • profiling • hexafluoroisopropanol (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) • 2,2,2-trifluoroethanol

Full-text PDF:

<http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?ICID=881120>

Word count:

2914

Tables:

1

Figures:

5

References:

45

Author's address:

Isabelle Fournier, Université Nord de France, CNRS, MALDI Imaging team, Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives. FRE 3249. Université Lille 1. 59650 Villeneuve d'Ascq. France. e-mail: isabelle.fournier@univ-lille1.fr

Background

After 10 years of continuous development MALDI mass spectrometry imaging (MSI) has become a powerful and versatile tool for analyzing different classes of endogenous and exogenous molecules [1,2]. It has become an established technology for imaging drugs and their metabolites [3,4]; molecular images of peptides and small proteins up to 25 kDa can be routinely obtained [2,5–8]; and recently, major improvements have also been reported for imaging lipids [9–13]. However, proteins exceeding 25 kDa are not routinely detected by MALDI MSI. This represents a real methodologic limitation, as many classes of proteins with important biological activities – such as most cytokines, growth factors, enzymes, receptors, proproteins, and neuropeptide precursors – are larger than 25 kDa. Two recent articles reported sample preparation methods that enable MSI of higher mass proteins [14,15]. The first method uses extensive water washing procedures to deplete abundant soluble proteins followed by automated application of a matrix solution containing a high percentage of organic solvent. This sample preparation allowed detection of a 28-kDa integral crystalline lens membrane protein [14]. In the second approach, a matrix application protocol using Triton X-100 was shown to help detect proteins ranging from m/z 25 000 to 50 000 [15].

These observations suggest several lines of reasoning for the lack of sensitivity for higher mass proteins, which can be exploited for the further development of sample preparation methods. The use of organic solvents or Triton X-100 suggests higher mass proteins may not be detected, because they are not efficiently solubilized in the matrix solution and consequently, are not extracted from the tissue. The detection of higher mass proteins after depletion of abundant soluble proteins suggests competition with the abundant proteins for incorporation into the matrix crystals and/or ionization in the MALDI process (suppression effects [16]) may be another reason limiting routine detection of higher mass proteins.

MALDI predominantly generates singly charged protein ions, so a high-mass protein ion will be detected at high m/z . The technology typically used for protein MSI, a time-of-flight mass spectrometer equipped with a micro-channel plate (MCP) detector, is not well-suited to the detection of high m/z ions. The initial impact of an ion onto the detector releases some electrons, which are then amplified through the MCP to generate the signal. The MCP detection process is known to favor lower m/z ions because the ion to electron conversion efficiency is nonlinearly dependent on velocity; exhibiting a threshold velocity below which no signal is obtained, then increasing rapidly with increasing velocity before reaching a plateau in which detector response is insensitive to increasing velocity [17].

In TOF analyzers, ion velocity is inversely proportional to the square root of the m/z ratio. Ions of high m/z may not be detected within the optimum detection-efficiency plateau and thus generate less detector signal. Furthermore, MCP detectors have a finite amplification potential within any single time-of-flight scan. Lower mass ions, detected first, can saturate the detector leading to even lower detection efficiencies for higher mass ions. In typical MALDI applications in

proteomics, such as peptide fingerprinting and LC-MALDI, high-mass insensitivity is rarely a problem because complex mixtures of proteins with masses above 20 000 are not analyzed. The tissue sections analyzed by MALDI MSI can result in a significant background, which is more intense in the low-mass region but continues throughout the entire mass range [18]. If detecting a wide mass range this background, as well as peptide/protein ions of lower mass, can saturate the MCP detector and further decrease the detection efficiency for higher mass protein ions.

In the present paper, we have investigated the development of sample preparation methods based on hexafluoroisopropanol (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP) [19,20] and 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) solvents for protein solubilization optimized for high-mass proteins. Using these sample preparation procedures proteins, up to 70 kDa were detected. This opens the door of protein biomarkers tracking directly from tissue without any extraction keeping their tissue localization.

Material and Methods

Materials

Sinapinic acid (SA), 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP), trifluoroacetic acid (TFA), 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE), ethanol (ETOH), acetone, acetonitrile (ACN), chloroform, water CHROMASOLV plus for HPLC (H₂O) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Samples

Rodent brains

Adult male Wistar rats weighing 250 to 350 g and adult, male, wild-type mice weighing 30 to 50 g (animal use accreditation by the French ministry of the agriculture No. 04860) maintained under standard care were used. Animals were killed by decapitation and immediately dissected to remove the brain, which was then flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Ovarian biopsies

Tissues, ascites, and cystic fluids were obtained with informed consent and institutional review board approval (CCPPRBM Lille: CP 05/83), from patients undergoing ovarian tumor resection at Hospital Jeanne de Flandre (Lille, France). Patient information was collected, including sex, age, treatment received before and after surgery, extent of surgery, current status (alive, alive with progressive disease, deceased, and cause of death), and survival from the time of original pathologic diagnosis. Samples were collected at the time of surgery, immediately frozen, and stored at -80°C until analysis.

Tissue preparation

Animal brains and ovarian biopsies

Thin 10- to 12- μm tissue sections were cut from frozen rat/mouse brains and ovarian biopsies using a Leica CM1510S cryostat (Leica Microsystems, Nanterre, France) and placed

onto ITO-coated conductive glass slides (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). For ovarian biopsies, histopathologic diagnoses were performed by a pathologist, blinded to the original clinical diagnosis, from adjacent H&E-stained sections. Tissue sections were submitted to different washing steps to remove salts and abundant lipids. Each tissue section were first immersed in a bath of cold acetone [21] for 30 seconds followed by a bath of cold ETOH 95% [22] for 30 seconds, and finally immersed in chloroform (21) for 1 minute.

MALDI MSI and profiling

Five mL of a solution containing 10 mg/mL of SA in AcN/aqueous TFA 0.1% (7:3, v/v) was prepared. The solution was deposited on to the tissue using an automatic sprayer (ImagePrep, Bruker Daltonics). Molecular images were acquired on an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics) equipped with a Micro-Channel Plate (MCP) detector. The instrument is equipped with a Smartbeam laser and is controlled by FlexControl 3.0 (Build 158) software (Bruker Daltonics). All protein spectra were processed with FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics) using the Top Hat baseline subtraction method and 4 cycles of Gauss smoothing with a width of 2 m/z .

Mass spectrometry imaging datasets were recorded in positive ion, linear time-of-flight mode, and averaged at 1000 laser shots for each position. Analysis of higher mass proteins required higher laser fluencies. Typically, for these experiments, the laser offset was set to 30%, laser range 20%, laser fluence 70%, and the laser focus set to medium. The images were acquired following a raster of 200 by 200 μm and reconstructed using FlexImaging 2.1 (Build 15) (Bruker Daltonics).

High-mass protein profiling

Two sample preparation procedures were developed. In the first procedure, a micropipette was used to deposit a droplet of 10 mg/mL SA in pure HFIP followed by a droplet of 20 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v). In the second procedure, a droplet of TFE: 20% TFA (1:1, v/v) was deposited onto the tissue, then a droplet of 20 mg/mL SA in ETOH: 0.1% TFA (9:1, v/v), and finally a droplet of 10 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v).

High-mass protein MSI

Automatic spraying

A solution of 10 mg/mL SA in TFE: 10% TFA (1:1, v/v) was first deposited on to a rat brain tissue section using 20 cycles of spraying for 1.5 seconds and drying for 30 seconds. A solution of 10 mg/mL SA in ETOH: 0.1% TFA (9:1, v/v), which was deposited after a final solution of 5 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v) using the same spraying method. High-mass protein analysis also was performed after imaging low mass polar proteins by removing the matrix from the tissue section with a bath of MeOH: H₂O (1:1, v/v) for 1 minute, and then applying the high-mass matrix solution.

Automatic micro-spotting

A chemical inkjet printer (CHIP-1000, Shimadzu, Kyoto, Japan) was used to sequentially deposit arrays of nl-sized

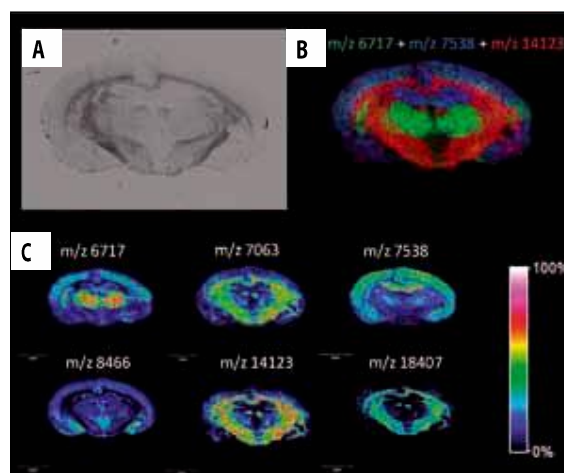


Figure 1. MALDI MSI of proteins obtained from a rat brain tissue section prepared by automatic spraying of the matrix solution 10 mg/ml SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v). (A) Optical image of the tissue section, (B) overlaid molecular images of protein ions detected at m/z 6717, 7538 and 14123, (C) molecular images of protein ions detected at m/z 6717, 7063, 7538, 8466, 14123 and 18407.

droplets of matrix solutions with a 300- μm pitch on to a rat brain tissue section. Fifteen nl of a solution of 10 mg/mL SA in TFE: 10% TFA (1:1, v/v) was first deposited onto the tissue, followed by 10 nl of a solution of 10 mg/mL SA in ETOH: 0.1% TFA (9:1, v/v), and finally by 15 nl of a solution of 5 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v).

Results

MALDI MSI of proteins

In MALDI MS as well as in MALDI MSI, proteins are typically analyzed using SA as matrix in a polar solvent such as AcN: 0.1% TFA. Figure 1 shows protein MSI measurements from a rat brain tissue section prepared using automatic spray deposit of the matrix solution 10 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v). These conditions generate a thin, homogenous layer of small crystals covering the tissue section and enabling images with specific distributions to be recorded (Figures 1A,C). Such sample preparation conditions are typically for high spatial fidelity MSI of proteins in tissue; however, only a restricted number of proteins and within a restricted mass range are typically observed, with most protein signals below m/z 25 000.

It has been shown that washing the tissue sections with organic solvents such as chloroform [21] and ETOH [22,23] before depositing the matrix provides spectra with a higher intensity and more protein signals in the mass range up to 20 000, and that Liam images can be obtained showing the specific location of the proteins. Without the organic wash, only a few proteins could be detected (Figure 2) that have a relatively low intensity and signal/noise ratio. In contrast, spectra acquired from tissue prewashed with organic solvents from an adjacent rat brain tissue section, show a high number of intense protein signals up to m/z 20 000 and a few protein signals with lower intensity above 20 000 m/z (Figure 2). This effect has been attributed to the removal

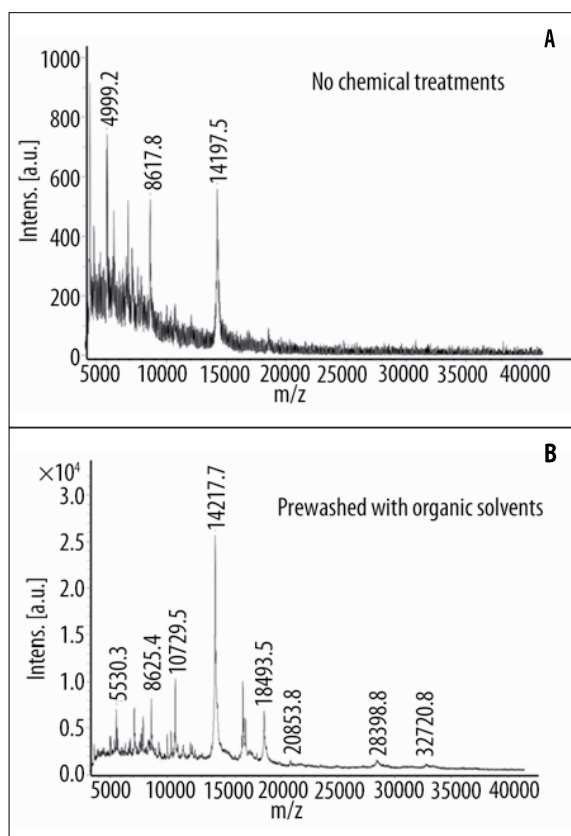


Figure 2. MALDI Mass spectra from rat brain tissue sections prepared by deposition of the matrix solution 10 mg/ml SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v). (A) unwashed tissue, and (B) tissue prewashed with successive baths of cold acetone, cold 95% EtOH, and chloroform prior to matrix deposition.

of salts and small organic compounds such as abundant lipids that lead to ion suppression effects [16]. Nevertheless, even with organic washes, protein signals above m/z 20 000 were either detected with very low intensity or not at all.

Sample preparation for high-mass profiling

In typical tissue proteomics experiments, protein extraction involves different steps to disrupt noncovalent interactions and separate the proteins from other molecules. The main interactions are noncovalent, including ionic, hydrogen bonds, and hydrophobic interactions. Hydrophobic interactions can be disrupted by using compounds or solvents that provide a competing hydrophobic environment or that disrupt protein structure (chaotropes). In polar solvents or pure water, a hydrophobic environment is created by detergents such as Triton X100 or SDS [24], and protein structures can be disrupted by chaotropes such as urea [25]. However, the high concentrations of detergents and chaotropes required for solubilization are mostly incompatible with MALDI mass spectrometry. Finally, denaturation of proteins by changing the solvent's pH has been shown to solubilize proteins with an efficiency close to that of SDS-based extraction [26]. With this background in mind, several procedures were investigated to improve protein solubilization, and thus, extraction and sensitivity.

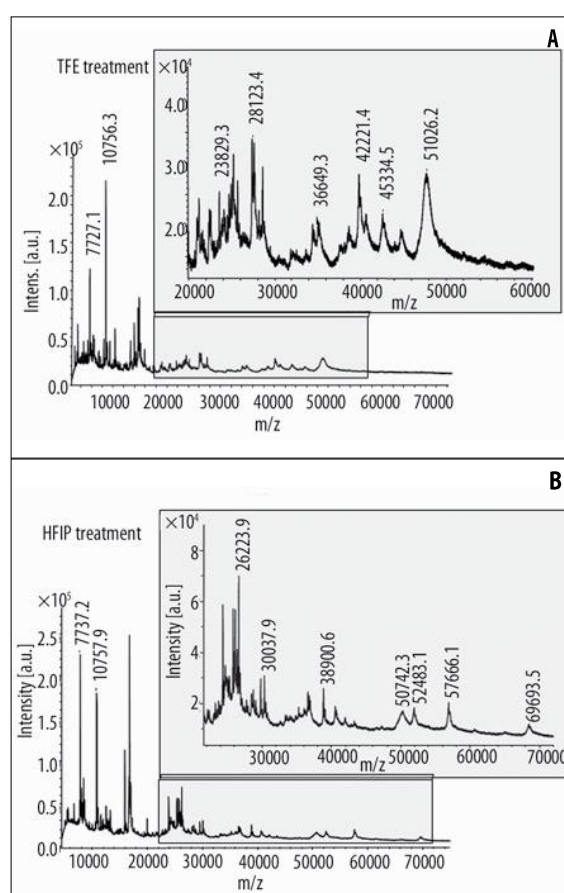


Figure 3. Mass spectra acquired from a rat brain tissue section after (A) TFE treatment and (B) HFIP treatment.

Initial experiments involved using a micropipette to deposit a 10% TFA solution onto a rat brain tissue sections to denature the proteins. A matrix solution of 20 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v) was then deposited onto the tissue. Close examination of the mass spectra obtained with this sample preparation method revealed no notable improvements. In a second study, the MSI compatible detergent octyl beta-D-glucopyranoside [27] was investigated. A solution of 10% TFA (aq.) containing 1% detergent was deposited onto rat brain tissue sections and subsequently covered with the same SA matrix solution. The mass spectra recorded using this second protocol also did not show any notable improvement compared with those obtained without any such treatment.

The matrix solution normally used to extract proteins from the tissue is based on the polar solvents AcN and 0.1% TFA (aq.). AcN is a relatively hydrophobic solvent known to solubilize many proteins of intermediate hydrophobicity. It was then investigated if the hydrophobic solvents TFE [28,29] and HFIP [30], which have been used to extract membrane proteins [31–33] and high-mass proteins [34], could aid in detecting high proteins directly from tissue.

A solution of 20% TFA: TFE (1:1, v/v) was deposited onto the tissue section to extract the proteins from the tissue. In MALDI, co-crystallization of proteins with the matrix is crucial for their analysis. As SA is not soluble in TFE, another

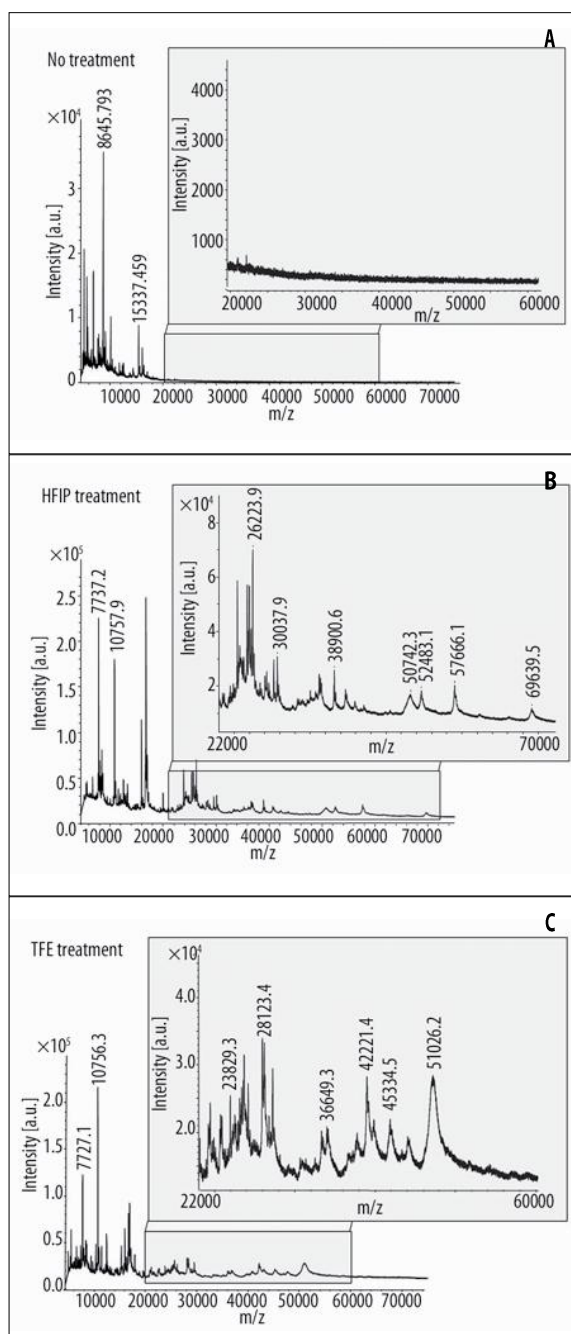


Figure 4. Mass spectra acquired from a rat brain tissue section after deposition of (A) SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v), and after removal of the first matrix coating followed by HFIP treatment (B) or TFE treatment (C).

solvent was used to dissolve the matrix. After the TFE treatment, 10 μ L of the solution 20 mg/mL SA in ETOH: 0.1% TFA (9:1, v/v) was deposited onto the tissue to co-crystallize the proteins with the matrix. However, this led to formation of large matrix crystals and a dramatic increase in chemical noise in the mass spectra. Recrystallization of the large matrix crystals by addition of a third solution, 20 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v), produced small white matrix crystals containing higher mass proteins. Mass spectra recorded from rat brain tissue sections after the

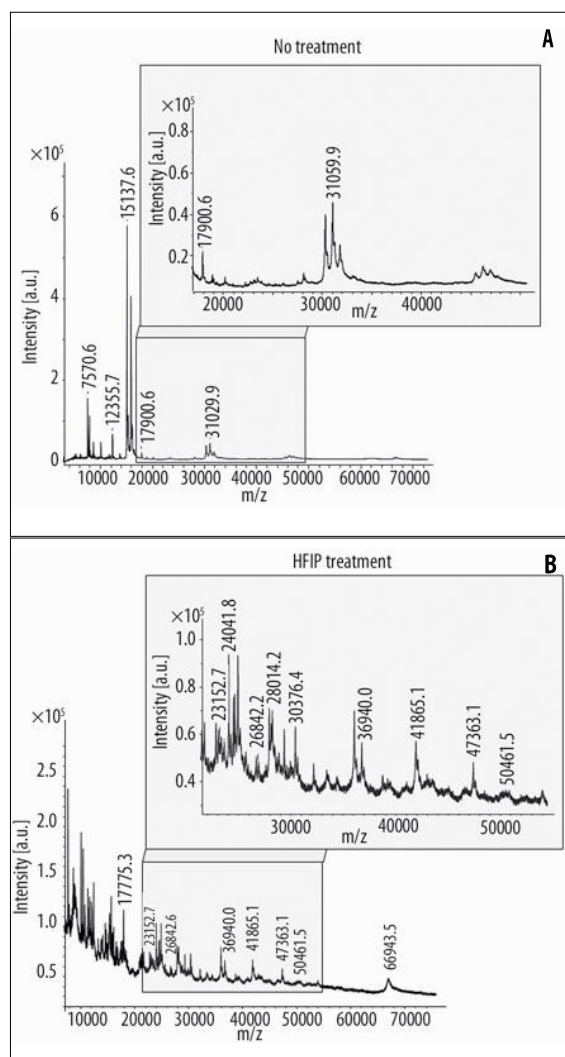


Figure 5. Mass spectra acquired from ovarian cancer tissue after deposition of (A) 20 mg/ml SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v), and after subsequent matrix removal and HFIP treatment (B).

complete 3-step procedure contained protein signals up to m/z 50 000 with good S/N (Figure 3A). In comparison, spectra from an adjacent tissue section that was not prepared using the 3-step TFE procedure contained no ions above m/z 30 000.

The number of steps needed for denaturation, extraction, and incorporation of high-mass proteins in matrix crystals using TFE makes it quite impractical for MSI. The solvent HFIP is known for its extraction efficiency of hydrophobic proteins and was found to be an excellent solvent of the matrix SA; therefore, enabling direct co-crystallization with high-mass proteins. It was found that high-mass proteins could be detected by depositing the matrix solution 20 mg/mL SA in pure HFIP, followed by addition of the recrystallization solution 20 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v). This led to detecting the higher mass proteins, up to m/z 70 000, with higher sensitivity and higher reproducibility than were obtained using the TFE procedure (Figure 3B).

Table 1. Molecular masses of peaks found in MALDI MSI after using the HFIP high-mass protein sample preparation that are consistent with known ovarian cancer protein biomarkers.

Protein name	Molecular mass (Da) determined by MALDI MSI with high-mass procedure	Molecular mass (Da) protein identified in ovarian cancer	References
Tetranectin (CAA45860)	17 775	17 776	[36–39]
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin precursor	22 576	22 571	[40]
Plasma retinol-binding protein precursor	22 986	22 990	[41]
Metalloproteinase inhibitor 1 precursor	23 152	23 153	[42]
Kallikrein 5 Precursor	26 842	26 838	[43]
Isoform 1 of Urokinase plasminogen activator surface receptor precursor	36 94	36 949	[44,45]

Figure 4 indicates that detecting high-mass proteins from tissue requires specific treatments using hydrophobic solvents. Smaller, polar proteins could be detected before high-mass protein analysis by sequential sample preparation and MSI analysis of the same tissue section. Rat brain tissue sections were first prepared using a solution containing 20 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v). After analyzing the tissue section, the matrix was removed by immersing the tissue in a bath of MeOH: H₂O (1:1, v/v) for 1 minute. The tissue was then dried, and the TFE or HFIP treatment applied. The spectrum obtained after the first matrix preparation, before TFE/HFIP treatment, included only low-mass proteins up to m/z 20 000 (Figure 4A). After removing the first matrix layer and HFIP/TFE treatment, high-mass proteins up to m/z 70 000 were obtained (Figure 4B,C). This strategy offers new perspectives for protein analysis and imaging from tissue sections by allowing, for the first time, measurement of small polar proteins followed by higher mass proteins.

Application in pathological proteomics: biomarker analysis

Recently, our group has applied MALDI MSI for biomarker research of ovarian cancer. MALDI MSI allowed detection of different markers, including the Cter fragment of the immunoproteasome 11s (m/z 9744) as a biomarker for serious cancers [35]. We tested high-mass sample preparation procedures on ovarian cancer biopsy samples to determine if additional proteins could be detected. This was performed as a second MSI experiment to retain the lower mass polar proteins provided by the standard sample preparation procedures. 10 μ l of the solution 20 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, v/v) was deposited onto an ovarian cancer biopsy tissue section. As shown in Figure 5A, many small, polar proteins were detected up to m/z 30 000 but few were found above this mass. After removal of this matrix using a bath of MeOH: H₂O (1:1, v/v), the HFIP procedure was applied. Figure 5B shows the MS spectrum obtained after HFIP treatment, the number of peaks detected in the m/z 20 000–50 000 range has clearly increased. Some masses are in line with ones detected in classic proteomics (Table 1). Future investigations will determine if the higher mass

proteins released using the new sample preparation strategies include new candidate biomarker proteins.

Discussion

To date, protein MSI of tissue sections has been limited to lower mass proteins. In this study, we developed new samples preparation protocols by improving protein extraction from the tissue. It was demonstrated that highly hydrophobic solvents HFIP and TFE enabled high-mass proteins to be detected, even without the high-mass detector. These treatments led to detection of proteins up to m/z 70000. High-mass procedures can be implemented after a regular MSI experiment of small, polar proteins to increase the number of proteins detected and to expand the mass range of proteins included in the analysis. This was performed with rat brain tissue and with ovarian cancer biopsy tissue, and demonstrated that small, polar proteins (first MSI experiment) and higher mass proteins (second MSI experiment) can be sequentially analyzed in a single tissue. The higher mass proteins made available by these strategies increase the possibility of detecting new candidate biomarkers.

Conclusions

Targeted chemical treatments are needed to improve protein extraction from tissue and to incorporate them into the matrix crystals. Future work will concentrate on improving protein sensitivity and translating these sensitivities to MSI, in which the need to minimize protein delocalization can reduce protein extraction efficiency.

References:

- McDonnell LA, Heeren RM: Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2007; 26: 606–43
- Fournier I, Wisztorski M, Salzet M: Tissue imaging using MALDI-MS: a new frontier of histopathology proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2008; 5: 413–24
- Reyzer ML, Caprioli RM: MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. *Curr Opin Chem Biol*, 2007; 11: 29–35
- Rubakhin SS, Jurchen JC, Monroe EB, Sweedler JV: Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery. *Drug Discov Today*, 2005; 10: 823–37

5. Chaurand P, Norris JL, Cornett DS et al: New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2006; 5: 2889–900
6. Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM: Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am J Pathol*, 2004; 165: 1057–68
7. Chaurand P, Schwartz SA, Caprioli RM: Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Curr Opin Chem Biol*, 2002; 6: 676–81
8. Franck J, Arafah K, Elayed M et al: MALDI IMAGING: State of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2009; 8(9): 2023–33
9. Burnum KE, Cornett DS, Puolitaival SM et al: Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. *J Lipid Res*, 2009; 50(11): 2290–98
10. Dreisewerd K, Lemaire R, Pohlentz G et al: Molecular profiling of native and matrix-coated tissue slices from rat brain by infrared and ultraviolet laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 2007; 79: 2463–71
11. Woods AS, Wang HY, Jackson SN: A snapshot of tissue glycerolipids. *Curr Pharm Des*, 2007; 13: 3344–56
12. Sugiura Y, Konishi Y, Zaima N et al: Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. *J Lipid Res*, 2009; 50(9): 1776–88
13. Murphy RC, Hankin JA, Barkley RM: Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *J Lipid Res*, 2009; 50(Suppl): S317–22
14. Grey AC, Chaurand P, Caprioli RM, Schey KL: MALDI Imaging Mass Spectrometry of Integral Membrane Proteins from Ocular Lens and Retinal Tissue. *J Proteome Res*, 2009; 8: 3278–83
15. Leinweber BD, Tsapralis G, Monks TJ, Lau SS: Improved MALDI-TOF imaging yields increased protein signals at high molecular mass. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009; 20: 89–95
16. Cohen SL, Chait BT: Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal Chem*, 1996; 68: 31–37
17. Gilmore IS, Seah MP: Ion detection efficiency in SIMS: dependencies on energy, mass and composition for microchannel plates used in mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom*, 2000; 202: 217–29
18. Norris JL, Cornett DS, Mobley JA et al: Processing MALDI Mass Spectra to Improve Mass Spectral Direct Tissue Analysis. *Int J Mass Spectrom*, 2007; 260: 212–21
19. Redeby T, Roeraade J, Emmer A: Simple fabrication of a structured matrix-assisted laser desorption/ionization target coating for increased sensitivity in mass spectrometric analysis of membrane proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004; 18: 1161–66
20. Redeby T, Carr H, Bjork M, Emmer A: A screening procedure for the solubilization of chloroplast membrane proteins from the marine green macroalga *Ulva lactuca* using RP-HPLC-MALDI-MS. *Int J Biol Macromol*, 2006; 39: 29–36
21. Lemaire R, Wisztorski M, Desmons A et al: MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem*, 2006; 78: 7145–53
22. Seeley EH, Oppenheimer SR, Mi D et al: Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008; 19: 1069–77
23. Schwartz SA, Rezyer ML, Caprioli RM: Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J Mass Spectrom*, 2003; 38: 699–708
24. Ames GF, Nikaido K: Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Biochemistry*, 1976; 15: 616–23
25. Herskovits TT, Jaillet H, Gadegbeku B: On the structural stability and solvent denaturation of proteins. II. Denaturation by the ureas. *J Biol Chem*, 1970; 245: 4544–50
26. Horst MN, Basha SM, Baumbach GA et al: Alkaline urea solubilization, two-dimensional electrophoresis and lectin staining of mammalian cell plasma membrane and plant seed proteins. *Anal Biochem*, 1980; 102: 399–408
27. Djidja MC, Francese S, Loadman PM et al: Detergent addition to tryptic digests and ion mobility separation prior to MS/MS improves peptide yield and protein identification for *in situ* proteomic investigation of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinoma tissue sections. *Proteomics*, 2009; 9: 2750–63
28. Zhang H, Lin Q, Ponnusamy S et al: Differential recovery of membrane proteins after extraction by aqueous methanol and trifluoroethanol. *Proteomics*, 2007; 7: 1654–63
29. Wang H, Qian WJ, Mottaz HM et al: Development and evaluation of a micro- and nanoscale proteomic sample preparation method. *J Proteome Res*, 2005; 4: 2397–403
30. Redeby T, Emmer A: Membrane protein and peptide sample handling for MS analysis using a structured MALDI target. *Anal Bioanal Chem*, 2005; 381: 225–32
31. Chertov O, Biragyn A, Kwak LW et al: Organic solvent extraction of proteins and peptides from serum as an effective sample preparation for detection and identification of biomarkers by mass spectrometry. *Proteomics*, 2004; 4: 1195–203
32. Ferro M, Seigneurin-Berny D, Rolland N et al: Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis*, 2000; 21: 3517–26
33. Wang W, Guo T, Rudnick PA et al: Membrane proteome analysis of microdissected ovarian tumor tissues using capillary isoelectric focusing/reversed-phase liquid chromatography-tandem MS. *Anal Chem*, 2007; 79: 1002–9
34. Thompson MR, Chourey K, Froelich JM et al: Experimental Approach for Deep Proteome Measurements from Small-Scale Microbial Biomass Samples. *Anal Chem*, 2008; 80: 9517–25
35. Lemaire R, Menguellet SA, Stauber J et al: Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *J Proteome Res*, 2007; 6: 4127–34
36. Begum FD, Hogdall CK, Kjaer SK et al: The prognostic value of plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in stage III ovarian cancer patients. *Anticancer Res*, 2004; 24: 1981–85
37. Deng X, Hogdall EV, Hogdall CK et al: The prognostic value of pretherapeutic tetranectin and CA-125 in patients with relapse of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2000; 79: 416–19
38. Hogdall EV, Hogdall CK, Tingulstad S et al: Predictive values of serum tumour markers tetranectin, OVX1, CASA and CA125 in patients with a pelvic mass. *Int J Cancer*, 2000; 89: 519–23
39. Lundstrom MS, Hogdall CK, Nielsen AL, Nyholm HC: Serum tetranectin and CA125 in endometrial adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 2000; 20: 3903–6
40. Lim R, Ahmed N, Borregaard N et al: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epitheliomesenchymal transition. *Int J Cancer*, 2007; 120: 2426–34
41. Gericke B, Raila J, Sehoul J et al: Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients. *BMC Cancer*, 2005; 5: 133
42. Rauvala M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T: Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. *Gynecol Oncol*, 2005; 99: 656–63
43. Diamandis EP, Borgono CA, Scorilas A et al: Immunofluorometric quantification of human kallikrein 5 expression in ovarian cancer cytosols and its association with unfavorable patient prognosis. *Tumour Biol*, 2003; 24: 299–309
44. Pedersen N, Schmitt M, Ronne E et al: A ligand-free, soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer. *J Clin Invest*, 2003; 92: 2160–67
45. Sier CF, Stephens R, Bizik J et al: The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients. *Cancer Res*, 1998; 58: 1843–49



Article 2

MALDI Imaging and Profiling MS of Higher Mass Proteins from Tissue

Alexandra van Remoortere,^a René J. M. van Zeijl,^a Nico van den Oever,^b Julien Franck,^c Rémi Longuespée,^c Maxence Wisztorski,^c Michel Salzet,^c André M. Deelder,^a Isabelle Fournier,^c and Liam A. McDonnell^a

^a Biomolecular Mass Spectrometry Unit, Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

^b Hogeschool Leiden, Leiden, The Netherlands

^c Université de Lille1, CNRS-FRE 3249, MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives, Villeneuve d'Ascq, France

MALDI imaging and profiling mass spectrometry of proteins typically leads to the detection of a large number of peptides and small proteins but is much less successful for larger proteins: most ion signals correspond to proteins of $m/z < 25,000$. This is a severe limitation as many proteins, including cytokines, growth factors, enzymes, and receptors have molecular weights exceeding 25 kDa. The detector technology typically used for protein imaging, a microchannel plate, is not well suited to the detection of high m/z ions and is prone to detector saturation when analyzing complex mixtures. Here we report increased sensitivity for higher mass proteins by using the CovalX high mass HM1 detector (Zurich, Switzerland), which has been specifically designed for the detection of high mass ions and which is much less prone to detector saturation. The results demonstrate that a range of different sample preparation strategies enable higher mass proteins to be analyzed if the detector technology maintains high detection efficiency throughout the mass range. The detector enables proteins up to 70 kDa to be imaged, and proteins up to 110 kDa to be detected, directly from tissue, and indicates new directions by which the mass range amenable to MALDI imaging MS and MALDI profiling MS may be extended. (J Am Soc Mass Spectrom 2010, 21, 1922–1929) © 2010 American Society for Mass Spectrometry

Since its inception 10 y ago, MALDI imaging mass spectrometry (imaging MS) has developed into a powerful and versatile tool for biomedical research [1, 2]. It is now routinely used for analyzing peptides and small proteins up to 25 kDa [3–6], administered drugs and their metabolites [7], and recently major improvements have been reported for lipids [8]. Despite this success, proteins exceeding 25 kDa are not routinely detected. Proteins larger than 25 kDa include many proteins with important biological activities, such as most cytokines, growth factors, enzymes, receptors, proproteins, and neuropeptide precursors. Increasing the mass range of proteins amenable to MALDI imaging MS might enable these biologically crucial proteins to be included in current applications, e.g., biomarker discovery.

The most common technique currently used to access larger proteins in MALDI imaging MS analyses is based on proteolytic digestion of the tissue's proteins followed by MALDI imaging MS of their tryptic peptides. Note on-tissue digestion has the additional advantage that it can be applied to formalin fixed tissues

as proteolytic peptides can be generated that are not bound within the cross-linked protein matrix. For example, Djidja et al. used on-tissue digestion to determine that the 78 kDa protein GRP78 may be a new candidate protein biomarker of pancreatic adenocarcinoma [9]. In principal, this 'bottom-up' strategy could enable proteins of any mass to be detected. In practice the large increase in complexity associated with proteolyzing the entire tissue's protein content will cause many tryptic peptides to have identical nominal mass [1], thus undermining the identification of potential biomarkers. Furthermore, bottom-up MALDI imaging MS discards all information regarding protein isoforms unless the appropriate tryptic peptides are explicitly included in the analysis. Recently it was shown that post-mortem protein degradation of GRP78, the protein identified as a candidate biomarker in the above bottom-up strategy, is isoform-dependent [10], and it is difficult to control protein degradation in human tissue samples. Direct MALDI imaging MS of proteins, if performed with sufficient mass resolution, would have the advantage that many isoforms can be identified on the basis of the resulting difference in mass.

MALDI imaging MS of higher mass proteins has been conspicuous by its rarity. Three recent articles have reported sample preparation methods that help

Address reprint requests to Dr. L. McDonnell, Biomolecular Mass Spectrometry Unit, Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Albinusdreef 2, 2333ZA Leiden, The Netherlands. E-mail: l.a.mcdonnell@lumc.nl

increase the mass range of proteins amenable to the technique. The first method uses extensive water washing steps to deplete abundant soluble proteins, followed by application of a matrix solution containing a high percentage of organic solvent. This preparation allowed the detection of a 28 kDa integral crystalline lens membrane protein [11], but would be difficult to apply as a general strategy as its success is based solely on extensive on-tissue protein purification of membrane proteins (which remain anchored to the insoluble membrane during the repeated water washes). The second method uses Triton X-100 and xylene to aid the detection of proteins ranging from m/z 25,000 to 50,000 [12]. The images were very noisy, indicating insufficient intensity, but provided several lines of reasoning for the lack of sensitivity for higher mass proteins. The use of organic solvents or Triton X-100 suggests higher mass proteins may not be detected because they are not efficiently solubilized by the matrix solution and consequently are not extracted from the tissue. Franck et al. recently extended these sample preparation strategies and reported how the solvents 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) and 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) could also be used for MALDI MS analysis of tissues [13]. Unfortunately the very low viscosity and harsh chemical abrasiveness of HFIP and TFE make them difficult to apply with the automated sample preparation stations commonly used for MALDI imaging MS.

All of the above sample preparation strategies report empirical methods by which the signals of higher mass proteins could be increased but have not addressed an inherent weakness in the mass spectrometry: MALDI predominantly generates singly charged protein ions so a high mass protein ion will be detected at high m/z . The technology typically used for protein MALDI imaging or profiling MS, a time-of-flight (TOF) mass spectrometer equipped with a micro-channel plate (MCP) detector, is not well suited to the detection of high m/z ions [14]. The initial impact of an ion onto the detector releases some electrons, which are then amplified through the MCP to generate the signal. The MCP detection process is known to favor lower m/z ions because the ion to electron conversion efficiency is nonlinearly dependent on velocity, exhibiting a 'threshold' velocity below which no signal is obtained, then increasing rapidly with increasing velocity before reaching a plateau in which detector response is insensitive to increasing velocity [15]. In TOF analyzers ion velocity is inversely proportional to the square root of the m/z ratio. Ions of high m/z may not be detected within the optimum detection-efficiency plateau and thus generate less detector signal. Furthermore, MCP detectors have a finite amplification potential within any single time-of-flight scan [16, 17]. Lower mass ions, detected first, can saturate the detector, leading to even lower detection efficiencies for higher mass ions [16, 17].

The lower sensitivity of TOF mass analyzers using MCP detectors for higher mass ions has been known for some time. Chen et al. have demonstrated that the

lower ion-to-electron conversion of higher mass ions, detector saturation, and m/z -dependent ion transmission (to the detector) are sufficient to explain the entirety of the observed decrease in signal intensity with increasing mass (without invoking any chemical bias) [14]. This study was primarily concerned with oligonucleotide detection but also demonstrated that protein analysis provided equivalent results. Furthermore, this investigation of the instrumental effects that are responsible for the decreased sensitivity of higher mass ions was performed using a simple mixture of just seven oligonucleotides. Even with this relatively simple system, saturation of the MCP detector could reduce the intensities of the heavier oligonucleotides by 80% [17]. In MALDI applications in proteomics, such as peptide fingerprinting and LC-MALDI, high mass insensitivity is rarely a problem since complex mixtures of proteins with masses above 20,000 are rarely analyzed. The tissue sections analyzed by MALDI imaging and profiling MS can result in a significant background, which is more intense in the low mass region but continues throughout the entire mass range [18, 19]. When detecting a wide mass range, this background will exacerbate MCP detector saturation and further decrease the detection efficiency for higher mass protein ions. Low mass ions are routinely deflected (or the detector bias switched) to avoid intense low mass ions, such as matrix and lipid ions, from saturating the detector [17]. Nevertheless in MALDI imaging and profiling MS the significant background and lower mass peptide and protein ions represent a high ion load that will reduce detection efficiency for higher mass ions.

Hillenkamp and workers have investigated high-mass detection of MALDI generated ions using a single stage dynode [20] and used this technology to analyze large molecular ions [21, 22]. Commercial detectors explicitly designed for the detection of higher mass proteins and protein complexes have been designed by Comet and CovalX. The Comet Macromizer is based on a superconducting tunnel junction (STJ) cryodetector. The STJ detector can detect very low kinetic energies and is able to perform single ion detection on the basis of their kinetic energy [23]. In a MALDI-TOF instrument, the kinetic energy of an ion is determined by the accelerating potential and charge state of the ion, consequently an STJ detector is able to detect all ions with equal efficiency (no mass dependence) [20]. A particular advantage of STJ detectors is that multiply charged ions can be distinguished on the basis of their higher kinetic energy. The higher detection efficiency and higher capacity of the STJ detector has been exploited for the analysis of complex protein mixtures: it was demonstrated that the STJ detector could detect multiple higher mass proteins that were not detected using an MCP [24]. Unfortunately the Comet Macromizer is no longer commercially available.

The high mass detectors from CovalX, HM1 and HM2, use an ion conversion detector to increase the detection sensitivity of higher mass ions: incident ions

first collide with a conversion dynode array to create smaller secondary ions, which are then reaccelerated into a secondary electron multiplier as higher velocity ions that are detected with higher sensitivity [25]. In addition to more sensitive detection of higher mass protein ions, these high mass detectors possess a much larger charge capacity and thus are not as prone to detector saturation as the typical MCP detector [25]. Here we demonstrate that a commercial detection system optimized for high mass ions and which is much less prone to detector saturation, CovalX's HM1 detector, significantly improves the sensitivity of MALDI imaging and profiling MS for higher mass proteins. Its combination with recently reported sample preparation procedures for accessing higher mass proteins enables these very large ions to be detected from tissue with higher sensitivity, and includes the demonstration of MALDI imaging MS of proteins exceeding 50 kDa and the first MALDI profiling MS of proteins exceeding 100 kDa.

Experimental

Materials

Sinapinic acid (SA), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), trifluoroacetic acid (TFA), ethanol (EtOH), acetone, acetonitrile (AcN), chloroform, Tween 20, sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100, and hydrogen peroxide were purchased from Sigma-Aldrich (Zwijndrecht, The Netherlands) and used without further purification. Peroxidase-blocking reagent containing 3% hydrogen peroxide was purchased from Dako (Heverlee, Belgium).

Samples

Adult male Wistar rats weighing 250–350 g and adult male wild type mice weighing 30–50 g (animal use accreditation by the French ministry of the agriculture no. 04,860) maintained under standard care were used. Animals were sacrificed by decapitation and immediately dissected to remove the brain, which was then flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Tissue Preparation

Thin 12 μm thick tissue sections were cut using a cryomicrotome and thaw mounted onto conductive glass slides (Delta Technologies, Stillwater, MN, USA). The tissue sections were then freeze dried for 1 h followed by different washing steps to remove salts and abundant lipids. Each tissue section was first immersed in a bath of cold acetone for 30 s followed by a bath of cold EtOH 95% for 30 s, and finally immersed in chloroform for 1 min. Different sample preparation procedures for MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins were then compared by manually depositing arrays of 0.5 μL droplets of matrix solution

using a micropipette (profiling) or applying a uniform coating of the matrix solution using an ImagePrep automated sprayer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Standard

Mouse brain tissue sections were washed with chloroform and ethanol and prepared with a matrix solution of 20 mg/mL SA in AcN:0.1% TFA (7:3, vol/vol).

HFIP

A matrix solution of 20 mg/mL SA in pure HFIP was deposited onto the washed tissue, followed by the addition of a recrystallization solution of 20 mg/mL SA in AcN: 0.1% TFA (7:3, vol/vol) [13].

Leinweber

Mouse brain tissue sections were placed onto a droplet of 20 mg/mL SA in 90% EtOH containing 0.5% Triton X-100 and 0.1% TFA. After the matrix solution was dry, a droplet of a suspension of SA in xylene (freshly prepared by sonication) was deposited onto the tissue and the tissue dried in a vacuum desiccator. Additional droplets of matrix were then added using 20 mg/mL SA solutions in 90% EtOH and in 50% AcN [12].

Tween

A matrix solution of 20 mg/mL SA in AcN:0.1% TFA (7:3, vol/vol) and containing a low concentration of Tween 20 was deposited onto the washed tissue and allowed to dry [26].

H_2O_2

A 3% solution of H_2O_2 was deposited onto the tissue and left to incubate for 30 min in a saturated vapor pressure chamber. The tissue was then dried in a vacuum desiccator and prepared using a matrix solution of 20 mg/ml SA in AcN:0.1% TFA (7:3, vol/vol).

Mass Spectrometry

All experiments were performed using an AutoFlex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an MCP detector and a high mass detector (HM1, CovalX, Switzerland) and were controlled using FlexControl 3.0. All protein spectra were then processed with FlexAnalysis 3.0 using the Top Hat baseline subtraction method and four cycles of Gauss smoothing with a width of 2 m/z .

MALDI mass analysis of higher mass proteins was found to require higher laser fluence. For these experiments, the laser offset was set to 30%, laser range to 20%, laser power to 70%, and the laser focus to medium. Mass analysis was performed using delayed extraction (800 ns), 20 kV acceleration voltage, and all ions below

3.5 kDa were suppressed using an ion deflector. The ion signals from 3.5–100 k m/z were recorded using a 0.5 GHz digitization rate and the mass spectra externally calibrated using insulin clusters and BSA clusters ($[nM H]^+$, $n = 1-4$ for insulin and $n = 1-2$ for BSA).

MALDI imaging MS experiments were performed using a pixel (and laser raster) size of 200 × 200 μm , 1000 laser shots for each pixel, and were acquired in fully automated mode using FlexImaging 2.1. Mass analysis of each pixel took ≈ 6 s.

Results and Discussion

It has previously been shown that washing the tissue sections with organic solvents such as chloroform and EtOH before matrix deposition increases the number and intensities of protein signals up to 20 kDa [27–29]. To test if the increased high mass sensitivity and charge capacity of the high mass HM1 detector may benefit imaging MS of higher mass proteins, mouse brain tissue sections were washed with chloroform and ethanol, prepared with a matrix solution of 20 mg/mL SA in AcN:0.1% TFA (7:3, vol/vol), and then analyzed using an AutoFlex III MALDI-ToF equipped with an MCP and a HM1 detector. When selected, the HM1 detector is mechanically moved into the ion optical flight path, in front of the MCP detector (18 cm on the Autoflex III). Once the detector is in position, the post-acceleration voltage (20 kV) and gain voltage (2 kV) are applied and the detector signal switched to the output of the HM1 detector. The whole process takes ≈ 1 min.

Figure 1 shows the spectra obtained by accumulating of 10,000 laser shots over the whole tissue. The MS spectrum recorded with the MCP detector shows many signals up to m/z 20,000 but only a few very low intensity peaks of higher m/z (Figure 1a). In contrast, the mass spectrum obtained with the high mass HM1 detector contains many peaks up to m/z 50,000 (Figure 1b). Several studies have established that the detection sensitivity of higher mass proteins using an MCP detector is highly attenuated in multi-component mixtures, due to detector saturation [14, 17, 24, 25]. The tissues analyzed in a MALDI imaging and profiling MS analysis contain a very large number of proteins that will exacerbate this loss of sensitivity due to detector saturation.

Images of proteins were obtained from another tissue section, obtained from a different region of a mouse brain, after washing in organic solvents and SA matrix deposition by automatic spraying using both the MCP and the high mass HM1 detectors. The dataset recorded with the high mass HM1 detector included many protein signals above m/z 30,000 with a mean S/N level above 4, Figure 2. Molecular images of the higher mass protein peaks detected at m/z 44,600, 46,800, and 66,000 all generated smooth images with clearly different distributions.

The highest mass MALDI images previously reported show the distributions of a protein detected at

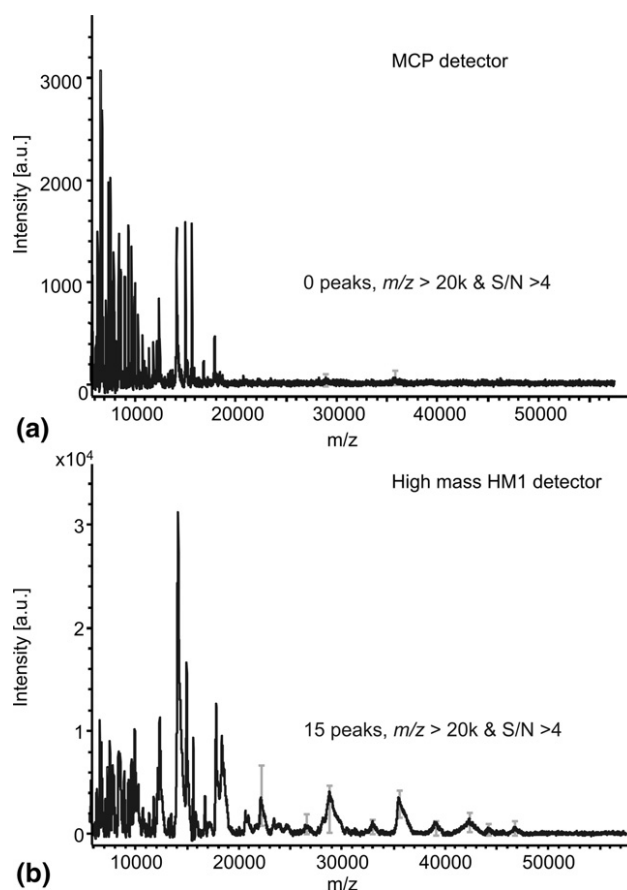


Figure 1. Example MS spectra from a single mouse brain tissue section after deposition of the matrix solution 20 mg/mL SA in AcN:0.1% TFA (7:3, vol/vol) and measured using an MCP detector (a) and the high mass HM1 detector (b). The number of peaks above 20 kDa with S/N ≥ 4 is indicated. The error bars show the variability of the higher mass protein peaks across six repeats. Note that the two detectors have different intensity scales.

m/z 47,900 [12] and at m/z 66,460 [30]. The former publication includes many peaks between 25 and 50 kDa, whereas the latter reports only the protein at 66,460. In the former report the tissue was prepared using a stepwise sample preparation protocol using Triton X-100 and xylene, which had been developed for the analysis of higher mass proteins, but the experiment was performed using an MCP detector. The results shown above clearly indicate that an MCP detector may under-represent protein ions of higher m/z .

Several sample preparation strategies have been reported for the analysis of higher mass proteins. A comparison of the mass spectra recorded with an MCP detector and the high mass HM1 detector for several of these sample preparation strategies explicitly demonstrates the higher sensitivities that can be obtained using the high mass HM1 detector. Figures 3a and b show the mass spectra obtained using the Triton X-100 and xylene protocol developed by Leinweber et al. [12]. The mass spectrum obtained using the MCP contains weak peaks at higher m/z with low S/N, which are consistent with the mass spectra and pixelated images

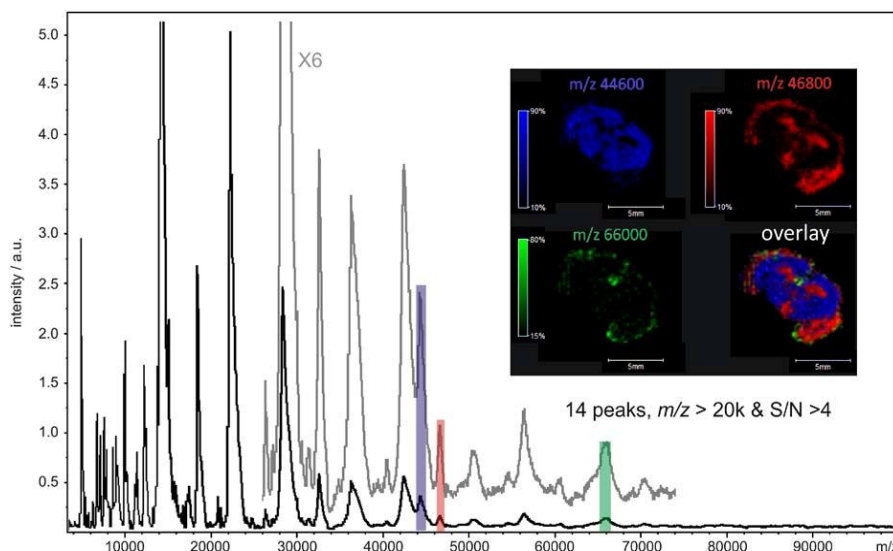


Figure 2. Mean mass spectrum and molecular images of proteins detected at m/z 44,600, 46,800, and 66,000 from a mouse brain tissue section using the high mass HM1 detector. The tissue was washed with chloroform and ethanol before deposition of the matrix solution 20 mg/mL SA in AcN:0.1% TFA (7:3, vol/vol).

included in the original article. When analyzed using the high mass HM1 detector intense peaks up to 50,000 m/z and several weaker peaks at even higher mass are obtained. Franck et al. recently reported a multistep sample preparation protocol based on the highly corrosive solvent HFIP [13]. The mass spectra obtained with the MCP can contain weak peaks up to 50,000 m/z , Figure 3c tissue 2, but sometimes the peaks are barely discernable, Figure 3c tissue 1. When analyzed with the high mass HM1 detector, both tissues generated a series of high intensity peaks up to 60,000 m/z . On occasion, the combination of the HFIP sample treatment and a high mass HM1 detector even led to the detection of peaks exceeding 100,000 m/z (supplementary Figure 1, which can be found in the electronic version of this article).

Figures 1, 2, and 3 demonstrate the increased sensitivity provided by the high mass HM1 detector and also indicate that low detection efficiency of higher mass proteins is one of the principal causes for their absence in previous MALDI imaging MS studies. Further support for this assertion was obtained by testing newly reported sample preparation strategies: Mainini et al. recently demonstrated that the addition of a small amount of chaotropic agents or detergents (0.05% SDS, PPS, or Triton X-100) to the matrix solution improved the intensity and number of protein peaks in the mass spectrum [26]. These experiments were performed using an MCP detector, and the majority of the protein peaks were detected at less than 25,000 m/z . The increased sensitivity for high mass proteins provided by the HM1 detector revealed that chaotropes and detergents could also aid in the detection of higher mass proteins. Figure 4a shows how the intensity of the peaks between 40,000 and 50,000 m/z increases with increasing

Tween content. An imaging analysis of two adjacent tissue sections, only one of which was prepared with Tween, clearly demonstrates that the higher mass proteins were only obtained from the tissue prepared with Tween (Figure 4a).

We then tested whether any of the steps from immunohistochemical protocols could be adapted for MALDI imaging and profiling MS, to improve the extraction and thus detection of higher mass proteins. Remarkably, it was found that the use of a commercially available peroxidase blocking solution containing 3% H_2O_2 also enhanced the detection of higher mass proteins. Figure 4b shows examples of profiles obtained from adjacent tissue sections prepared by first treating the tissue with a 3% H_2O_2 solution and then depositing the standard 20 mg/mL sinapinic acid matrix solution. As can be seen, a series of intense protein peaks were obtained up to 50 kDa, as well as some weaker peaks of even higher mass. The application of H_2O_2 has been shown to oxidize cysteine and methionine residues [31] and to lead to the partial denaturation of proteins [32]. As occurs with chaotropes such as SDS, we speculate that H_2O_2 aided denaturation of proteins might increase their solubilization in the matrix solution.

Closer inspection of the spectra obtained with the MCP and HM1 detectors, Figures 1 and 3, revealed that several of the higher mass peaks observed with the HM1 detector were sometimes also observed with the MCP but were detected with much lower intensity. This is consistent with the higher detection efficiency of higher mass ions using the HM1 detector: the profiling mass spectra are the result of 10 k accumulated single-laser-shot mass spectra, the HM1 detector ensures a larger fraction of the higher mass ions contribute to the final accumulated spectrum. Nevertheless, the underlying

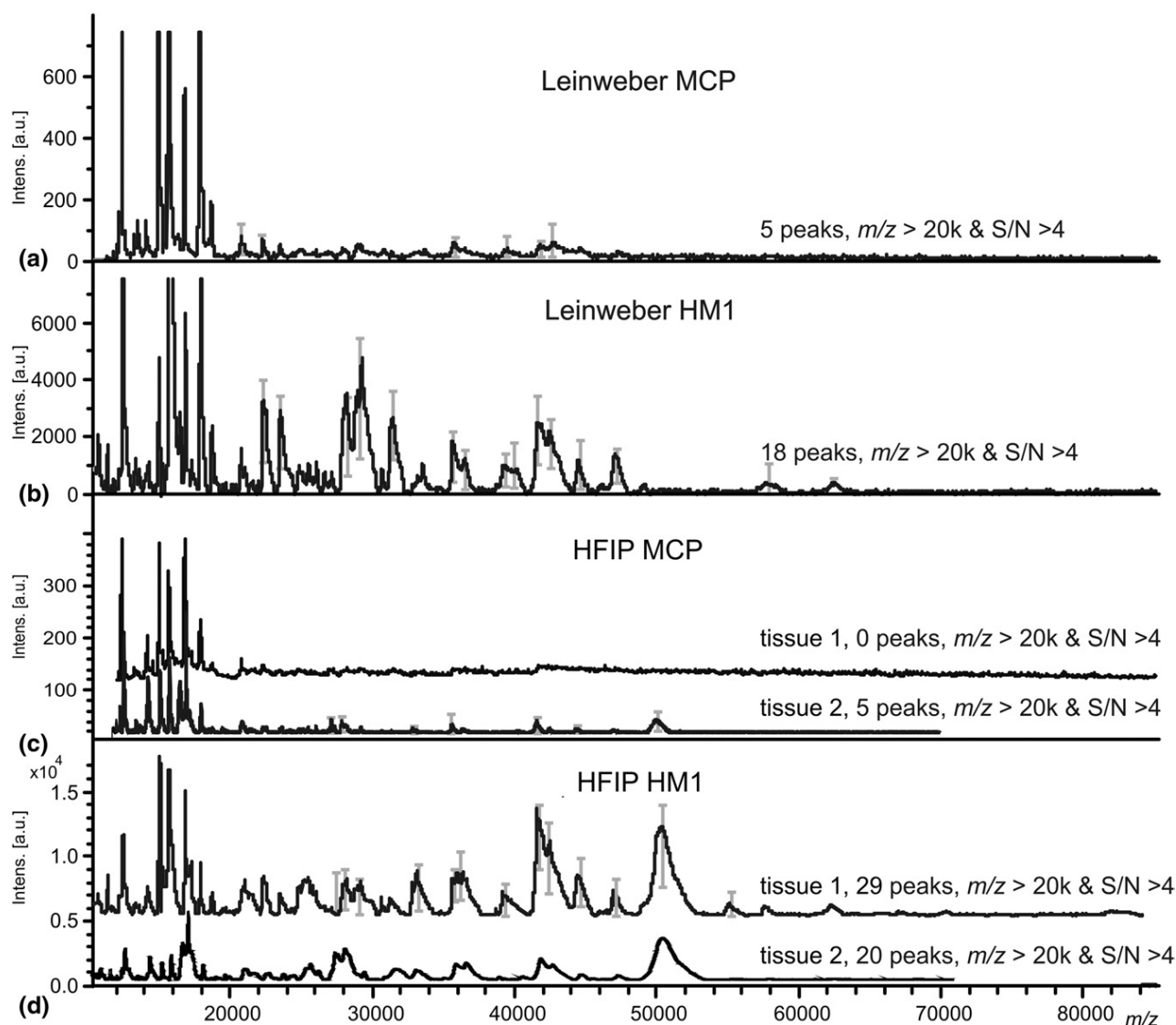


Figure 3. Comparison of spectra obtained from previously published sample preparation protocols for higher mass proteins using an MCP and a high mass HM1 detector. Leinweber [12] protocol using an MCP (a) and the HM1 detector (b). HFIP protocol [13] using an MCP (c) and the HM1 detector (d). The number of peaks above 20 kDa with a S/N > 4 is indicated. The error bars show the variability of the higher mass protein peaks across six measurement repeats. Note that the two detectors have different intensity scales.

ing spectrum, the ions produced by the experiment, remains identical. For MALDI imaging MS experiments, in which each pixel is analyzed with fewer laser shots, the increased sensitivity offered by the high mass HM1 detector for higher mass proteins ensures that more pixels contribute signal to the final image (Figure 2).

The above results demonstrate that a range of different sample preparation strategies enable higher mass proteins to be analyzed provided they are detected with sufficient efficiency. However, the mass resolution of the peaks in the spectra measured with the high mass HM1 detector are lower than those measured using the MCP detector, and is a consequence of the post-acceleration of the secondary ions after the conversion dynode (which provides the high mass sensitivity). The

low mass resolution of the high mass HM1 detector reduces its suitability for MALDI imaging and profiling MS because too many protein signals overlap. Nevertheless, it clearly demonstrates that the lack of detection of higher mass protein ions is partly due to the low detection efficiency of higher mass protein ions using MCPs, a phenomenon which is exacerbated by the significant chemical background. The HM1 detector has been designed for the detection of very large protein ions and protein complexes, including masses exceeding 10^6 Da. For very large molecules, i.e., several hundred kDa and greater, the detected peak width is limited by the isotopic distribution and adduct formation [33] and not by the response time of the detector. For the mass range accessible by MALDI imaging and

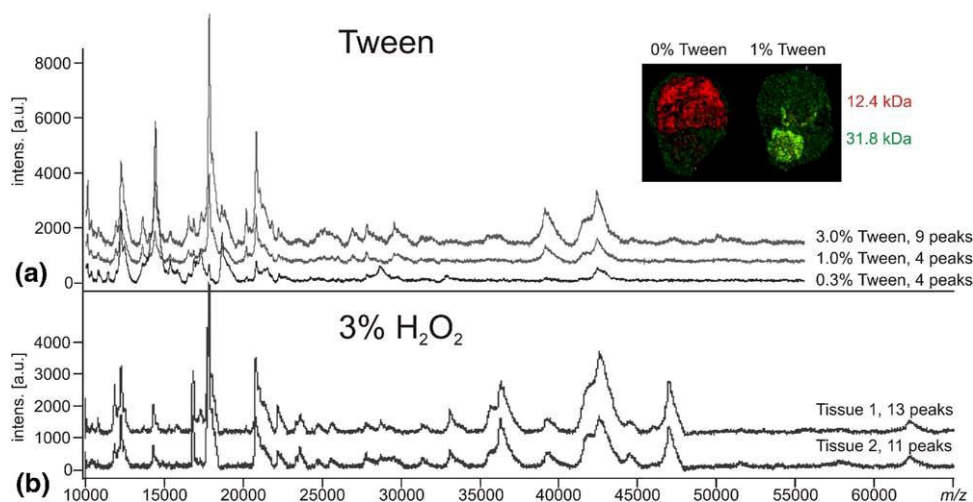


Figure 4. (a) Addition of the detergent Tween 20 to the matrix solution 20 mg/mL SA in AcN:0.1% TFA (7:3, vol/vol) leads to the detection of more high mass protein ions. (b) Pretreatment of the tissue with a 3% H₂O₂ solution before the deposition of the matrix solution 20 mg/mL SA in AcN:0.1% TFA (7:3, vol/vol) leads to the detection of higher mass proteins. The number of peaks above 20 kDa with a S/N = 4 is indicated.

profiling MS, below 150 kDa, it would be beneficial to decrease the response time of the high mass HM1 detector (350 ns), or CovalX's revised HM2 detector (250 ns), to 10 ns while maintaining improved sensitivity and lack of saturation.

Conclusion

Tissue analysis using MALDI imaging and profiling MS experiments can generate rich spectra containing many peptides and proteins. However, the number of lower mass proteins, < 25 kDa, far exceeds those of higher mass. The results shown here clearly demonstrate that many existing sample preparation protocols generate higher mass protein ions but the ions are detected with low efficiency using the standard MCP detector. The increased signal intensities of higher mass proteins obtained with the high mass HM1 detector, relative to an MCP, are consistent with the latter's known loss of detection sensitivity with increasing mass and ion load [14]. MALDI imaging and profiling MS generates a significant chemical background [18], which will exacerbate any losses of sensitivity due to saturation. The increased detection sensitivity and, particularly, the lack of detector saturation provided by the HM1 detector, enables the acquisition of spectra containing proteins up to 70 kDa as well as the detection of even higher mass proteins. These results, the first reporting the utility of such detectors for MALDI imaging and profiling MS, demonstrate that the sensitive analysis of higher mass proteins directly from tissue requires a detector technology that can withstand the high chemical background and detect higher mass proteins with higher efficiency.

Acknowledgments

The authors acknowledge funding for this work by the ZonMw Horizon program Multiplex Imaging of Tissue Arrays, project number 93519026 (L.McD.), and by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Direction de la Politique Industrielle et Institut des Sciences de la Vie (to M.S. and I.F.), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to I.F.), Institut du Cancer (INCA to I.F.).

Appendix A Supplementary Material

Supplementary material associated with this article may be found in the online version at [doi:10.1016/j.jasms.2010.07.011](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.07.011).

References

- McDonnell, L. A.; Corthals, G. L.; Willems, S. M.; van Remoortere, A.; van Zeijl, R. J. M.; Deelder, A. M. Peptide and Protein Imaging Mass Spectrometry in Cancer Research. *J. Proteom.* **2010**, epub ahead of print.
- McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A. Imaging Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 606–643.
- Chaurand, P.; Latham, J. C.; Lane, K. B.; Mobley, J. A.; Polosukhin, V. V.; Wirth, P. S.; Nanney, L. B.; Caprioli, R. M. Imaging Mass Spectrometry of Intact Proteins from Alcohol-Preserved Tissue Specimens: Bypassing Formalin Fixation. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3543–3555.
- Cornett, D. S.; Reyzer, M. L.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. MALDI Imaging Mass Spectrometry: Molecular Snapshots of Biochemical Systems. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 828–833.
- Franck, J.; Arafah, K.; Elayed, M.; Bonnel, D.; Vergara, D.; Jacquet, A.; Vinatier, D.; Wisztorski, M.; Day, R.; Fournier, I.; Salzet, M. MALDI Imaging Mass Spectrometry: State of the Art Technology in Clinical Proteomics. *Mol. Cell. Proteom.* **2009**, *8*, 2023–2033.
- Seely, E. H.; Caprioli, R. M. Molecular Imaging of Proteins in Tissues by Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 18126–18131.
- Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A. Compound and Metabolite Distribution Measured by MALDI Mass Spectrometric Imaging in Whole-Body Tissue Sections. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260*, 195–202.
- Burnum, K. E.; Cornett, D. S.; Puolitaival, S. M.; Milne, S. B.; Myers, D. S.; Tranguch, S.; Brown, H. A.; Dey, S. K.; Caprioli, R. M. Spatial and Temporal Alterations of Phospholipids Determined by Mass Spectrom-

- etry During Mouse Embryo Implantation. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 2290–2298.
9. Djidja, M. C.; Claude, E.; Snel, M. F.; Scriven, P.; Francese, S.; Carolan, V.; Clench, M. R. MALDI-Ion Mobility Separation-Mass Spectrometry Imaging of Glucose-Regulated Protein 78 kDa (Grp78) in Human Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Pancreatic Adenocarcinoma Tissue Sections. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4876–4884.
 10. Scholz, B.; Sköld, K.; Kultima, K.; Fernandez, C.; Waldemarson, S.; Savitski, M.; Svensson, M.; Borén, M.; Andrén, P.; Zubarev, R.; James, P. Impact of Temperature-Dependent Sampling Procedures in Proteomics and Peptidomics—a Characterization of the Liver and Pancreas Post-Mortem Degradome. *Mol. Cell. Proteom.* **2010**, in press.
 11. Grey, A. C.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M.; Schey, K. L. MALDI Imaging Mass Spectrometry of Integral Membrane Proteins from Ocular Lens and Retinal Tissue. *J. Proteom. Res.* **2009**, *8*, 3278–3283.
 12. Leinweber, B. D.; Tsapralis, G.; Monks, T. J.; Lau, S. S. Improved MALDI-TOF Imaging Yields Increased Protein Signals at High Molecular Mass. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 89–95.
 13. Franck, J.; Longuespée, R.; Wisztorski, M.; Remoortere, A. V.; Zeijl, R. V.; Deelder, A.; Salzet, M.; McDonnell, L.; Fournier, I. MALDI Mass Spectrometry Imaging of Proteins Exceeding 30,000 Dalton. *Med. Sci. Monit.* **2010**, *16*, epub ahead of print.
 14. Chen, X.; Westphall, M. S.; Smith, L. M. Mass Spectrometric Analysis of DNA Mixtures: Instrumental Effects Responsible for Decreased Sensitivity with Increasing Mass. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5944–5952.
 15. Gilmore, I. S.; Seah, M. P. Ion detection Efficiency in SIMS: Dependencies on Energy, Mass, and Composition for Microchannel Plates Used in Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *202*, 217–229.
 16. Coeck, S.; Beck, M.; Golovko, B.; Delauré, V. V.; Herbane, M.; Lindroth, A.; Kopecky, S.; Kozlov, V. Y.; Kraev, I. S.; Phalet, T.; Severijns, N. Microchannel Plate Response to High-Intensity Ion Bunches. *Nucl. Instrum. Methods A* **2006**, *557*, 516–522.
 17. Westman, A.; Brinkmalm, G.; Barofsky, D. F. MALDI Induced Saturation Effects in Chevron Microchannel Plate Detectors. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, *169/170*, 79–87.
 18. McDonnell, L. A.; van Remoortere, A.; van Zeijl, R. J. M.; Deelder, A. M. Mass Spectrometry Image Correlation: Quantifying Colocalization. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3619–3627.
 19. Norris, J. L.; Cornett, D. S.; Mobley, J. A.; Andersson, M.; Seeley, E. H.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. Processing MALDI Mass Spectra to Improve Mass Spectral Direct Tissue Analysis. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260*, 212–221.
 20. Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U. The Detection of Large Molecules in Matrix-Assisted UV-Laser Desorption. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, *4*, 301–305.
 21. Berkenkamp, S.; Kirpekar, F.; Hillenkamp, F. Infrared MALDI Mass Spectrometry of Large Nucleic Acids. *Science* **1998**, *281*, 260–262.
 22. Berkenkamp, S.; Menzel, C.; Karas, M.; Hillenkamp, F. Performance of Infrared Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Lasers Emitting in the 3 μm Wavelength Range. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1399–1406.
 23. Wenzel, R. J.; Matter, U.; Schultheis, L.; Zenobi, R. Analysis of Megadalton Ions Using Cryodetection MALDI Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4329–4337.
 24. Yanes, O.; Avilés, F. X.; Wenzel, R.; Nazabal, A.; Zenobi, R.; Calvete, J. J. Proteomic Profiling of a Snake Venom Using High Mass Detection MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 600–606.
 25. Wenzel, R. J.; Kern, S.; Zenobi, R. *Proceedings of the 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*; Seattle, WA, May, 2006.
 26. Mainini, V.; Angel, P.; Caprioli, R. M. *Proceedings of the 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*; Salt Lake City, UT, May, 2010.
 27. Lemaire, R.; Wisztorski, M.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. MALDI-MS Direct Tissue Analysis of Proteins: Improving Signal Sensitivity Using Organic Treatments. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7145–7153.
 28. Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. Direct Tissue Analysis Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Practical Aspects of Sample Preparation. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 699–708.
 29. Seeley, E. H.; Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. Enhancement of Protein Sensitivity for MALDI Imaging Mass Spectrometry After Chemical Treatment of Tissue Sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1069–1077.
 30. Mangé, A.; Chaurand, P.; Perrochia, H.; Roger, P.; Caprioli, R. M.; Solassol, J. Liquid Chromatography-Tandem and MALDI Imaging Mass Spectrometry Analyses of RCL2/CS100-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues: Proteomics Evaluation of an Alternate Fixative for Biomarker Discovery. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5619–5628.
 31. Milzani, A.; Rossi, R.; Semplicio, P. D.; Giustarini, D.; Colombo, R.; DalleDonne, I. The Oxidation Produced by Hydrogen Peroxide on Ca-ATP-G-Actin. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1774–1782.
 32. Kim, Y. H.; Berry, A. H.; Spencer, D. S.; Stites, W. E. Comparing the Effect on Protein Stability of Methionine Oxidation Versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 343–347.
 33. Bahr, U.; Stahl-Zeng, J.; Gleitsmann, E.; Karas, M. Delayed Extraction Time-of-flight MALDI Mass Spectrometry of Proteins above 25,000 Da. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 1111–1116.

Article 3

Received: 2010.XX.XX
Accepted: 2010.XX.XX
Published: 2010.XX.XX

Authors' Contribution:

- A** Study Design
- B** Data Collection
- C** Statistical Analysis
- D** Data Interpretation
- E** Manuscript Preparation
- F** Literature Search
- G** Funds Collection

MALDI Imaging Mass Spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers

Mohamed El Ayed ^{1,2} (BD)*, David Bonnel ^{1,3} (BCD)*, Rémi Longuespée ^{1,3} (BF), Céline Castellier ^{1,4} (B), Julien Franck ¹ (BD), Daniele Vergara ¹ (B), Annie Desmons ¹ (B), Aurélie Tasiemski ¹(B), Abderraouf Kenani ² (EF), Denis Vinatier ⁴ (AG), Robert Day ³ (EG), Isabelle Fournier ¹ (ADEFG), Michel Salzet ¹ (ADEFG)

*co authors

¹ Université Nord de France, CNRS, MALDI Imaging team, Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives, Université Lille 1, Lille, France

² Laboratoire de Biochimie - Unité de Recherches "Mécanismes Moléculaires et Pathologies", Faculté de Médecine de Monastir, Monastir, Tunisie

³ Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

⁴ Clinique de Gynécologie, Hôpital Jeanne De Flandre, CHRU Lille, Lille, France

Source of support: Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to IF), Institut du Cancer (INCA to IF), Institut de Recherche en Santé du Canada (ISRC to MS & RD), Région Nord-Pas de Calais (to DB & RL)

Background:

Among biomarkers, cancer-antigen 125 (CA-125) is the most studied. We propose an analytical tool to track ovarian carcinoma biomarkers, that is, the MALDI mass spectrometry imaging.

Material/Methods:

Ovarian carcinomas and benign ovaries were directly analyzed by MALDI-TOF-MS. After automatic profiling and mass spectrometry imaging analyses, hierarchical clustering based on principal component analysis in nonsupervised mode was carried out. On the same samples, preparations were performed to investigate peptides, then proteins, followed by high mass proteins, in an automatic profiling to specific signatures for diagnosis. Using tissue bottom-up strategy on tissue digestion, and mass spectrometry imaging after by shotgun sequencing by nano-LC-IT-MS in MS/MS mode from washing samples from on tissue digested peptides, several biomarkers were found.

Results:

A list of specific biomarkers from the ovarian carcinoma regions was obtained and classified as proteins associated with cell proliferation, involved in immune response modulation, signaling to the cytoskeleton, and tumor progression. These specific biomarkers were then validated by immunocytochemistry using Tag-mass technology, cell biology, and Western blot, and by PCR (using SKOV-3 ovarian epithelial cancer cells). A link between the immune regulation (innate immunity, tolerance) and virus cause is also discussed.

Conclusions:

From the biomarkers identified, proteins involved in immune response modulation and cell proliferation have been pointed out in this study. Two new markers have been identified using such a strategy, that is, fragment C-terminal of the PSME1 (Reg-Alpha) and mucin-9.

key words:

MALDI imaging • pathologies • innate immunity • proteomics • PCA • hierarchical clustering

Full-text PDF:

<http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?CID=XXXXXX15059>

Word count:

XXXX

Tables:

4

Figures:

7

References:

76

Author's address:

Michel Salzet, Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives, FRE CNRS 3249, 59650 Villeneuve d'Ascq. France. e-mai: michel.salzet@univ-lille1.fr

Background

Ovarian cancer is the fourth leading cause of cancer death among women in Europe and the United States. Among biomarkers, cancer-antigen 125 (CA-125) is the most studied. CA-125 has a sensitivity of 80% and a specificity of 97% in epithelial cancer (stage III or IV). However, its sensitivity is around 30% in stage I cancer, its increase is linked to several physiological phenomena and it is also detected in benign situations [1]. CA-125 is particularly useful for at-risk population diagnosis and for following illness evolution during therapeutic treatment. In this context, CA-125 is insufficient as a single biomarker for ovarian cancer diagnosis. Thus, other biomarkers are required to use a proteomic strategy for diagnosis [2–10].

At this time, 2 strategies have been undertaken by researchers. Indeed, several groups have tried to identify ovarian cancer markers in plasma or serum using SELDI-TOF profiling or chromatography coupled to mass spectrometry [3,11–16]. Other groups have developed a classic proteomic strategy using comparative 2D-gels and mass spectrometry [10,17–19].

Here, we propose another strategy based on direct tissue analysis and peptide profiling followed by MALDI profiling and imaging. Ovarian carcinomas (stages III and IV) and benign ovaries were directly analyzed by MALDI-TOF-MS. Hierarchical clustering based on principal component analysis (PCA) was carried out using ClinProTools software to classify tissues. Principal component analysis was used in the unsupervised mode to differentiate tumorous and healthy spectra based on their proteomic composition as determined by MALDI-MSI. Two stage IV tumor regions as well as 2 healthy regions were identified. To validate the procedure, 2 biomarkers identified in the 2 carcinoma regions were characterized using tissue MS-MS and nanolc-IT-MS. Validation was performed by specific MALDI imaging using the Tag-mass concept, and PCR was performed on mRNA extracted from patients or from an epithelial cancer cell line (SKOV3). The first biomarker was identified as a fragment of the immunoproteasome Reg-Alpha [20], and the second was identified as orosomucoid.

Taken together with recent results from gastric cancer diagnosis [21,22], our results suggest that MALDI-MSI is a promising technology for tumor classification and for identifying specific biomarkers in various types of tumors.

Material and Methods

Materials

α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA), 3-acetylpyridine (3AP), 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) ammonium bicarbonate (NH_4CO_3), trisma base, xylene, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), acetonitrile (AcN), angiotensin II, Des-Arg-bradykinin, substance P, ACTH 18-39, ACTH 7-38, and bovine insulin were obtained from Sigma-Aldrich and used without any further purification. Trypsin was from Promega. AspN, LysC enzyme was from Roche. Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Applied Biosystems. Acetonitrile p.a. and methanol p.a. were from J.T. Baker.

Samples

Tissues, ascites, and cyst fluids were obtained with informed consent and institutional review board approval (CCPPRBM Lille: CP 05/83) from patients undergoing any ovarian tumor resection at Hospital Jeanne de Flandre. A total of 48 tissue samples from 25 patients with grade III and IV ovarian cancer, and 23 benign tumors, were analyzed. Patient information was collected, including sex, age, treatment received before and after surgery, extent of surgery, current status (alive, alive with progressive disease, deceased, and cause of death), and survival from the time of original pathologic diagnosis. Samples were collected at the time of surgery, immediately frozen, and stored at -80°C until analysis. Typically, 10- to 12- μm thick sections were cut using a cryostat and thaw-mounted on flat, electrically conductive sample slices. Histopathologic diagnoses were made by an anatomopathology blinded to the original clinical diagnosis from subsequent H&E-stained sections.

Tissue preparation

Frozen ovary sections were immediately transferred onto a conductive Indium-Tin Oxide (ITO) glass (Bruker Daltonics, Wissenbourg, France). After drying the sections for 5 minutes at room temperature, tissues were heated to 37°C for 20 seconds to adhere to slides and placed under a vacuum for 10 minutes. They were then rinsed in chloroform and analyzed in MALDI ms for MALDI imaging analyses [23].

MALDI Imaging and Specific MALDI Imaging

Automated tissue profiling

For automated profiling assays, markers of 3 mass ranges were screened for each section. After the tissue treatment, 10 μL of HCCA 10 mg/mL in ACN/TFA 0.1% 7:3 were dropped to perform the analysis of peptides. The laser settings for these analyses were power 40%, offset 65%, range 20%, small focus, and 150 ns of pulsed ion extraction. A methanol 100% wash was then used to remove the matrix, and 10 μL per section of SA 20 mg/mL in AcN/TFA 0.1% were dropped to perform the analysis on the proteins mass range. The laser settings were power 45%, offset 65%, range 20% small focus, and 150 ns of pulsed ion extraction. Ten μL of SA 10 mg/mL in HFIP 100%, then 10 μL of SA 20 mg/mL in ACN/TFA 0.1% 7:3 were then dropped to perform the analysis on high-mass proteins after their extraction from the tissue section [24]. For each analysis, 1000 shots were accumulated for 50 spectra per tissue section.

MALDI Imaging

A solid ionic matrix (sinapinic acid SA/3AP) was prepared just before use and was deposited using a Chemical Inkjet Printing CHIP-1000 device (Shimadzu, Kyoto, Japan) after a raster of spots spaced by 250 μm center to center. Briefly, 4.8 μL (1 equivalent) of 3AP was added to a solution containing 10 mg/mL of SA in ACN/aqueous TFA 0.1% (6/4, v: v). The solution was agitated for several minutes before use. Five droplets of approximately 100 pL were deposited at each spot per cycle. Twenty iterations were necessary to reach the total final volume of 10 nL. Images were acquired using an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument

(Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a smart beam laser with a repetition rate of 200 Hz [25] and controlled by FlexControl 2.5 software (Bruker Daltonics). Images were performed in positive reflectron mode and MALDI-MS spectra were acquired in the mass range from 550 to 5000 Da. Six-hundred spectra were acquired at each spot using a laser frequency of 100 Hz. The images were recorded and reconstructed using Fleximaging II 2.5 (Bruker Daltonics) software.

Specific MALDI Imaging

For specific MALDI imaging studies, ovary sections were incubated at room temperature with 500 μ L buffer (0.1 M PBS / 1% BSA / 1% normal goat serum / 0.05% triton \times 100) for 30 minutes [26,27]. The same buffer was used to dilute the Reg alpha antibody (1/100) (Zymed Laboratories, Invitrogen, ref. 38–2400), and incubation was performed overnight at 4°C. After 3 washes in PBS, sections were incubated overnight with anti-Human IgG photocleavable tagged rabbit antibody (1/100) (Eurogentec) at 4°C [28,29]. The tissues were then rinsed 3 times for 5 minutes with ultrapure water to remove salts, and sections were dried at room temperature before matrix application. In the case of the orosomucoid (alpha 1 glycoprotein) biomarker, a monoclonal antibody (MCA3312Z) was purchased from AbD Serotec and used at a dilution of 1/50. The secondary antibody is an anti-human IgG photocleavable tagged mouse antibody (1/100) (Eurogentec).

Automatic trypsin digestions

The printed array of the CHIP-1000 on the tissue section was composed of spots spaced by 250 μ m center-to-center. A total of 40 nL of solution containing 25 μ g/mL of trypsin in water was applied to each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited at each spot per cycle. Forty iterations were necessary to obtain the final volume.

MS/MS of digested and derived tissues

MALDI-TOF MS/MS experiments on digested and derived tissue sections were performed using an Ultraflex II TOF-TOF instrument equipped with a LIFT III cell. For MS/MS experiments, the following parameters were set: laser repetition rate of 100 Hz with 33% attenuation, ion source voltages of 8 kV and 7.3 kV on the MALDI sample plate and first electrode; LIFT cell pulse from ground for electrode 1 and 2 to 19 kV; and in the last step, electrode 3 was decreased to 3.2 kV. Reflector end voltage was set to 29.5 kV and mid-grid to 13.85 kV. For each MS/MS spectrum, 1000 total shots were averaged, including 200 for parent ions and 800 for fragments. Laser fluence was constant over the experiments.

Protein identification in databanks was performed using Biotoools 3.0 software (Bruker Daltonics) connected to the Phenix search engine interrogating the NCBI, Swissprot, EST, or MSDB databases. Methionine oxidation was set as the variable modification, and no fixed modification was used. Taxonomy was specified to be human. Trypsin was selected as the enzyme, and 2 missed cleavages were settled. The mass tolerance was set at 1 and 0.5 Da for the MS and MS/MS.

Bottom-up analyses

Peptide tissue extractions

Slices were washed with acetonitrile (60%) acidified with HCl 1N (w/5v). The collected supernatants were incubated overnight at 4°C with gentle rocking. After centrifugation at 12 000 rpm for 30 minutes at 4°C, the supernatants were loaded on Sep-Pak C18 cartridges (500 μ L extract/cartridge; Waters). After washing with 5 mL acidified water (0.05% TFA, Pierce), samples were eluted with 5 mL 60% AcN in acidified water (0.05% TFA). Sixty percent of the eluted fraction was reduced in a vacuum centrifuge (Savant). This fraction was resuspended in 100 μ L acidified water (0.05% TFA) and fractionated on a C18 reversed-phase HPLC column (4.6 mm \times 25 cm, Interchim) equilibrated with acidified water (0.05% TFA). Elution was performed with a linear gradient of acetonitrile in acidified water (0.05%) from 0% to 70% at a flow rate of 500 μ L/min. Each fraction was collected manually before being evaporated in a SpeedVac vacuum and resuspended with 50 μ L of HPLC grade water. Each fraction was analyzed by MALDI-TOF-MS before trypsin digestion.

Trypsin digestion

After drying, samples (extracted peptides) were placed on ice for 30 minutes in 50 μ L of protease solution (sequence grade-modified trypsin, Promega, at 0.02 mg/mL in 25 mM (NH₄HCO₃). Digestion was performed overnight at 37°C. Peptide extraction was performed twice for 15 minutes with 50% acetonitrile, 1% TFA for further MALDI-MS analysis, or with 50% acetonitrile, 1% formic acid for further ESI-MS/MS analysis. Trypsin digests were then lyophilized in a SpeedVac concentrator and resuspended in 5 μ L of 0.1% formic acid.

For nanoLC-ESI MS samples

Ten patients with grade III and IV ovarian cancer and 10 benign tumors were analyzed.

The cancer tissue sample contains serous cystadenoma, mucinous cystadenoma, and borderlines tissue.

For nanoLC-ESI MS analysis, on a section of 2 cm², *in situ* enzymatic digestion is performed by adding 15 μ L of trypsin enzyme (0.033 μ g/ μ L in 25 mM Tris buffer pH 7.4) for 1 hour at room temperature. After enzymatic digestion, purification of resulting digestion peptides was achieved by using reverse phase C₈ coated silica magnetic beads (ClinProts, Bruker Daltonics) according to the protocol of the manufacturer modified for tissues. For this, 15 μ L of binding solution was directly applied onto the tissue during 1 minute, and then 15 μ L of magnetic bead was added on the section. Extraction occurred during 10 minutes. During this step, beads and digested products were mixed 3 times using a micropipette directly onto the tissue. Digestion solution and beads were then deposited in a polypropylene tube and washed 3 times using 500 μ L of H₂O/TFA 0.1%. Peptides were eluted from the beads with 30 μ L of ACN/H₂O (1:1, v/v) and solution was dried by vacuum centrifugation. For nano LC-MS/MS identification, peptides were redissolved in H₂O/MEOH 0.1% formic acid (9:1 v/v) after elution and evaporation.

Table 1. Forward and reverse primer sequences used in RT-PCR are shown 5' to 3'.

Primer designation	Forward primer	Reverse primer
Orosomuroid	CTGGGAGAGTTCTACGAAGC	CCTCCTGTTTCTCTCCTT
Actin	AGCGCAAGTACTCCGTGTG	GACTGGGCCATTCTCCTTAG
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCTGTTGCTGTA

Nano LC-nanoESI-IT MS and MS/MS

Analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000 plus, Bucker Daltonics) equipped with a nano ESI ion source and on-line coupled to a nano HPLC system. An injection of 0.5 μ L of digest was made with a Switchos Autosampler (Dionex corporation) and separation performed on a C18 silica bonded stationary phase (75 μ m id, 150 mm long, 3 μ m 100 \AA pore size, Dionex). Samples were washed for 2 minutes at 10 μ L/min with 100% mobile phase A (95% H₂O, 5% ACN 0.1% formic acid). Peptides were then eluted using a linear gradient of 1%/minute mobile phase B (ACN 80%, H₂O 20%, formic acid 0.08%) for 70 minutes at a flow rate of 0.2 μ L/min. The Esquire was operated in a data-dependent MS/MS mode in which 1 MS full scan was followed by 1 MS/MS scan on the most-abundant peptide ion. Collision energy was set to 35%. The heated capillary temperature and electrospray voltage were 160°C and 1.5kV respectively.

Protein identification was performed under MASCOT sequence query search program using SwissProt database filtered for the taxonomy "human." A tolerance of 1 Da for peptide and 0.5 Da for MS/MS was set. Only protein sequences with MOWSE score higher than 20 (indicating significant homology or identity) and identified in several samples representing at least 4 significant MS/MS were considered. Methionine oxidation and acetylation of N-terminal were defined as variable modification.

Statistical data analysis

For statistical analyses, mass spectra were internally recalibrated on common peaks (also known as *spectral alignment*) and normalized to the total ion count. An average spectrum created from all single spectra was used for peak selection and to define integration ranges. These integration ranges were used to obtain the intensities or areas of single spectra. Signal intensities were used for all calculations. For the principal component analysis and hierarchical clustering, the individual peak intensities were standardized across the data set. The Principal Component Analysis (PCA) was carried out using Pareto scaling, which uses the square root of the standard deviation as a scaling factor to reduce the dominance of large-scale intensity changes in the matrix and other high-abundance ions, as these may mask variations in lower abundance ions during PCA. The overall outcome of PCA is greatly affected by the masking of the underlying relevant information by ions related to matrix coating and other endogenous molecules. Under unsupervised PCA, each spectrum is classed as an individual so the principal components are selected and account for the greatest separation of each of the individual spectra.

RNA isolation and PCR analysis

mRNA from biopsies or the SKOV-3 cell line was extracted in 2 mL tubes prefilled with Qiazol reagent (Qiagen, France) and 1.4 mm ceramic beads. The mixture was shaken twice for 45 seconds at 6500 rpm in a Precellys 24 homogenizer (Bertin distributed by Ozyme, France). RNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions, and the total extracted RNA was treated with RQ1DnaseI (Promega, France) to prevent genomic DNA contamination. First strand cDNA was generated from 2 μ g of total RNA using random primers (Promega, France) and the Superscript III reverse transcriptase (RT) kit (Invitrogen, France) in a final volume of 60 μ L.

Omitting RT or RNA from the reaction mixture resulted in nonamplification and no-template controls. cDNA was treated with RNaseH (Promega, France) to optimize the amplification. For the TLR, Reg-alpha fragment and orosomuroid genes, forward and reverse primers (Table 1) were designed with the Primer3 Input software (http://fjdo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Toll Like Receptor (TLR) primer pairs were obtained from Krug et al. [29] Actin, GAPDH and 18S were used as reference genes. In each case, PCRs were performed for 30 cycles using Advantage 2 polymerase (Clontech) with an elongation time of 2 minutes. All PCR products were subcloned into the pGEM-T easy vector (Promega) and cDNA clones were sequenced with an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems).

qPCR analyses for virus detection genes

Epstein-Barr Virus R-gene quantification kit and CMV HHV6,7,8 R-Gene diagnostic kit (CE-IVD labeled are purchased at Argene and performed on Applied Biosystems 7500 as recommended by the manufacturer.

SKOV-3 cells stimulation and immunohistochemistry

The human epithelial ovarian cancer cell line SKOV-3 was grown in RPMI-1640 medium with glutamine, supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Cells were treated with TGF-b (10 ng mL⁻¹) for 24 hours in the absence of serum (B). Controls cells were left untreated (A). For confocal microscopy analysis, cells were fixed for 5 minutes with 3.7% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) solution, permeabilized with a 0.1% solution of Triton X-100 in PBS, followed by 30 minutes incubation at room temperature with phalloidin-TRITC (Sigma). Slices were then mounted in glycerol and examined using a confocal microscope (Zeiss LSM 510). Control cells have a typical epithelial-like morphology in culture flask/Petri with the tendency to form dense colonies.

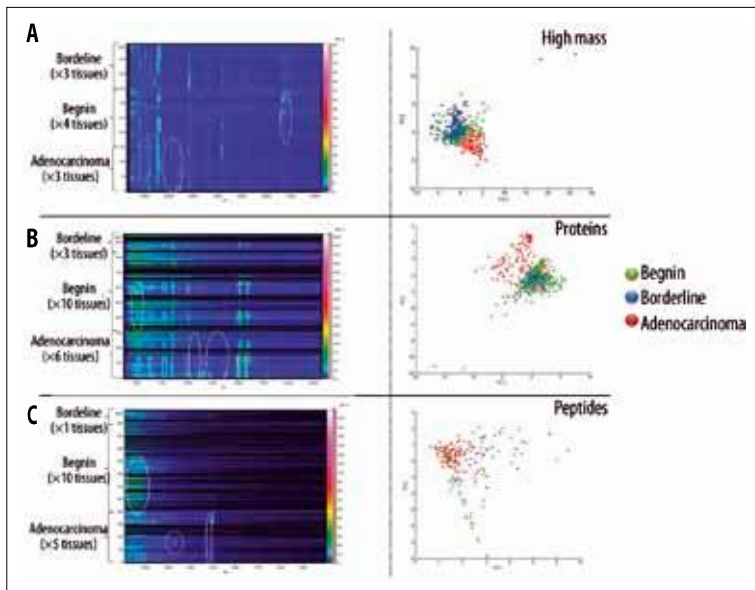


Figure 1. Automatized MALDI profiling on three ovarian tissues classes: adenocarcinoma, borderline and benign. **(A)** Pseudogel and supervised PCA loading plot obtained for a high mass procedure. **(B)** Protein profile procedure. **(C)** Peptide procedure.

Western blotting

Whole cell lysates (in lysis buffer as described above) containing 50 μg of total proteins (COF1, PROF1) (Sigma) were diluted in cold RIPA buffer, resolved on 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels (mini protean II electrophoresis system, BioRad) and blotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% w/v nonfat dry milk in TBS containing 0.1% Tween-20 (Sigma) and probed with selected primary antibodies. After incubation with secondary antibodies, immunoblots were visualized with the ECL detection kit (Amersham Biosciences).

Results

Automatic profiling and PCA for biomarkers tracking

Automatic profiling was performed on 20 samples (10 benign, 6 carcinoma, 3 borderline) laid on the same slides and submitted to peptides, then small proteins and finally, high mass proteins tracking using 3 in-house methods, 1 after 1 based on classical matrix deposition and solvent treatments [23,24,30,31]. The analyses of a MALDI imaging data set by molecular mass images can be illustrated as a pseudogel (Figure 1). In peptides conditions (with HCCA as matrix), carcinoma specific signatures can be found for m/z around 3300 and 4800, whereas in a benign larger zone for m/z ranged 1200 to 2000 can be found. As can be seen, the borderline profile resembles the benign one. The principal component analysis (PCA) analyses confirm the observation (Figure 1). For small proteins (with SA as matrix), 2 signatures can be seen for m/z comprised between 9500 and 14 000 and 1 around 17 500 in carcinoma samples.

It is difficult to discriminate between borderline and benign profiles except for a specific signature at m/z , ranging between 4900 and 5200 is specifically detected in benign samples, which is absent in both carcinoma and borderline profiles (Figure 1). In high-mass proteins, a specific zone comprised between m/z 23 000 and 25 000 in carcinoma whereas in benign and borderline profiles a zone between

m/z 65 000 and 68 000 is detected (Figure 1). Principal component analyses (PCA) confirmed the eyes detected zones but 2 others are detected through statistics in carcinoma; that is, 1 around m/z 9000 and 12 000; 1 between m/z 23 000 and 24 000, and the last 1 around m/z 35 000–37 000 (Figure 1). In a borderline profile PCA analyses detected a zone between m/z 5300 and 5000 and in begin a cross-zone with the malignant 1 at m/z 10 000 and 11 000 (Figure 1).

All together, these data show that it is necessary to perform on same samples the 3 procedures, helped with PCA analyses to have a clear overview of different classes of biomolecules present in the samples and to drive the biomarker hunting. In this context, as it can be seen in Figure 1B, a classic procedure using SA as matrix for peptides and small proteins did not allow one to detect high-mass proteins, only polar ones can be obtained. Thus, the HFIP procedure [32] was applied, and the number of peaks detected in the m/z 20 000 to 50 000 range was clearly increased (Figure 1A). Interestingly, several of these peaks are consistent with previously identified biomarkers using classic 2D proteomic procedures (Table 2), suggesting that the chemical treatments could enable known biomarkers to be recorded directly from tumor regions in tissue biopsies. These show that MSI can be more complementary to the classic proteomic for biomarker tracking.

MALDI Imaging Mass Spectrometry and Principal Component Analyses for biomarkers tracking

MALDI imaging mass spectrometry analyses were performed on carcinomas tissues (stage III or IV) followed by PCA analyses using SA/3AP as matrix (Figure 2A). Unsupervised PCA was used to attempt to identify hidden variables between spectra taken from various regions of ovarian biopsy (Figure 2B). Figure 2B shows the score plots for unsupervised PCA. Plot PC1/PC2 shows the best separation, and 2 groups can be separated; that is, tumor versus healthy regions, which is in line with the histologic data (Figure 2C). A zoom of the most-separated ions from the PC1/PC2 plot is presented in Figure 2D, and a group of

Table 2. Molecular masses of known ovarian cancer protein biomarkers and masses found by MALDI MSI after using the HFIP high-mass protein preparation procedure compared to molecular masses of previously identified ovarian cancer markers.

Protein Name	Mw (Da) MALDI MSI with high mass procedure	Mw (Da) Protein previously identified in OVC	References
Tetranectin (CAA45860)	17 775	17 776	[67–70]
Neutrophil Gelatinase-associated lipocalin precursor	22 576	22 571	[71]
Plasma retinol-binding protein precursor	22 986	22 990	[72]
Metalloproteinase inhibitor 1 precursor	23 152	23 153	[73]
Kallikrein 5 Precursor	26 842	26 838	[74]
Isoform 1 of Urokinase plasminogen activator surface receptor precursor	36 940	36 949	[75,76]

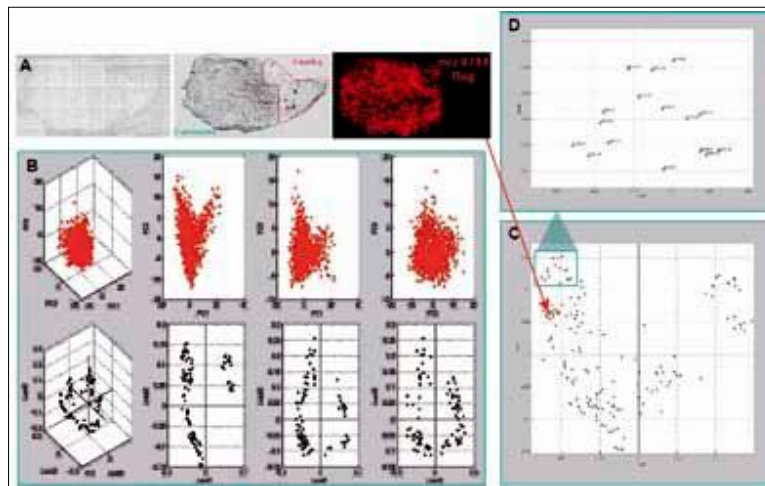


Figure 2. MALDI MSI analyses of a mucinous adenocarcinoma stage IV. **(A)** mucinous ovarian carcinoma section containing tumor and healthy parts submitted to automatic matrix deposition using a micro-spotter (CHIP-1000, Shimadzu). Location of the C-terminal part of Reg-alpha (m/z 9744) biomarker confirming the location of the tumor portion of the biopsy slice. **(B)** PCA analyses through PC1, PC2 and PC3 of the mucinous ovarian carcinoma. **(C)** Statistical PCA analyses with PC1 as tumor and PC2 as healthy tissue. Location of tumor biomarker vs protein present in the healthy part. **(D)** Zoomed view of the most-differentiated m/z corresponding to part of the specific tumor biomarkers.

specific biomarkers was detected. Their locations in the tumor region are presented in Frank et al. (2009) [33]. From the PCA results, we detected a fragment of the (PSME 1: Proteasome activator complex subunit 1, named the Reg alpha fragment), previously identified [20], is present in the cancer group with other biomarkers and not present in healthy tissue.

Biomarker identification

From the list of biomarkers detected by PCA analyses, we detect the ion at m/z of 9744, which corresponds to the fragment C-terminal of Reg alpha [20]. We validate it here through MSI (Figures 2A, 3A,B), immunocytochemistry (Figure 3C,F), Western blot (Figure 3D), and molecular biology (Figure 3E) confirmed its specificity to ovarian carcinoma. Ion at m/z of 9744 corresponding to the C-terminal part of PSME1 is detected in the carcinoma area by MSI (Figure 3A,B), which is confirmed by immunocytochemistry, with an antibody raised against the C-terminal part of the protein (Figure 3C). Western blot analyses of benign or carcinoma samples were performed either with an antibody raised against the N-terminal of PSME1 or the 1 directed against the C-terminal part (Figure 3D).

The data reflect the antibody raised against the N-terminal part recognizes the protein in both carcinoma and benign samples, whereas the antibody raised against the C-terminal recognizes its epitope only in carcinoma samples, which is in line with previous data [20] and the immunocytochemical results (Figure 3F). Figure 3F shows that this C-terminal fragment is over-present in epithelial cells of carcinoma (Figures 3F a, b, e, i). It can be detected in endometrioid nondifferentiated (Figure 3F c) or differentiated (Figure 3F a) carcinoma, sero-mucinous adenocarcinoma (Figure 3F e), and clear-cell adenocarcinoma (mesonephroma) (Figure 3F i). In benign tissues, the immunolabeling is also at the level of the epithelial cells, but more nucleus than in carcinoma as can be observed in (Figures 3F f, h) the adenofibromatous tumor (Figure 3F g). All together, these data are in line with the transcriptomic results performed on the SKOV-3 epithelial carcinoma cells (Figure 3E), confirming overexpression of PSME1 gene in this carcinoma cell line. These data confirm that Reg-alpha is a specific ovarian biomarker. We recently discovered it in ascites liquid (data not shown).

For the other biomarkers detected by PCA analyses, we could detect the some have already been found in genomic

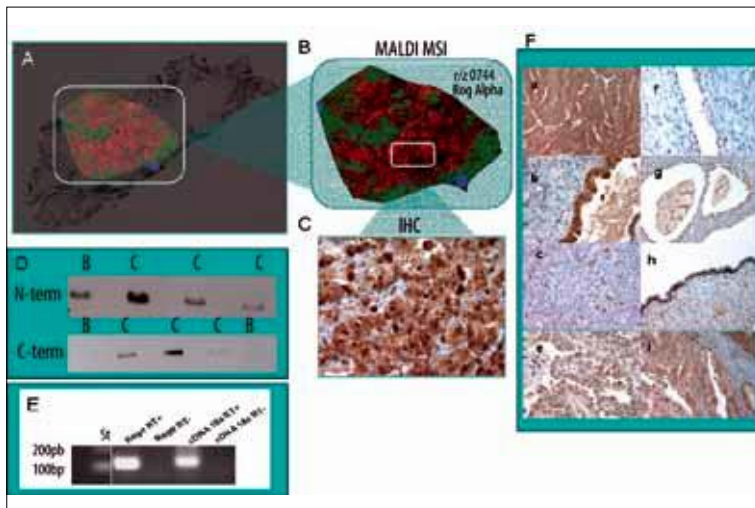


Figure 3. Validation of Reg-alpha C-terminal fragment. (A) MSI analyses of carcinoma section (red corresponding to ion at m/z : 9744, Reg alpha fragment). (B) Zoom of the MSI image of the ion at m/z : 9744, Reg alpha fragment. (C) Immunocytochemical analyses with antibody raised against the C-terminal fragment on stage IV carcinoma sections. Most of the epithelial cells are labeled. (D) Western blot analyses with benign (B) or carcinoma from different patients (C) with antibodies directed against either the N-terminal or C-terminal parts of PSME1. (E) RT-PCR analyses of PSME1 of mRNA extracted from SKV03. (F) Immunocytochemical studies with polyclonal antibody raised against the c-terminal part of Reg alpha. (a) Epithelial cells of immunolabeled differentiated endometrioid carcinoma, (b) Epithelial cells of immunolabeled in carcinoma region. (c) Cytoplasmic epithelial cells immunolabeling of nondifferentiated endometrioid carcinoma. (d) Epithelial cells of immunolabeled in clear cells adenocarcinoma (mesonephroma). (e) Nuclear epithelial cells immunolabeling of benign tumor. (f) Nuclear epithelial cells immunolabeling of adenofibromatous tumor. (g) Nuclear epithelial cells immunolabeling of seromucous area in benign tumor. (h) Cytoplasmic epithelial cells immunolabeling of sero-mucinous adenocarcinoma.

studies, and share the same mass, for example, protein S100-A12 (m/z 10568) and apolipoprotein A1 (m/z 10155) [34]. We decided to remove the MALDI matrix from the slides through a washing procedure and analyze samples by MALDI before and after trypsin digestion [32] (Figure 4). The differentiated ions then were subjected to MS/MS analysis by MALDI before analysis by nanoLC-IT/MS in MS/MS mode. For example, the ion at m/z 1160.5 detected by MALDI in a patient sample after trypsin digestion (Figure 4) was subjected to MS/MS analysis (Figure 5A). The obtained sequence of WFYIASAFR with a score of 42 (Figure 5B) was confirmed by the IT-MS/MS data, and it belongs to orosomucoid 1. Five others fragments were characterized and gave 30.3% sequence coverage (Figure 5B). The presence in the biopsy of the mRNA coding for this protein was confirmed by RT-PCR from patient with ovarian carcinoma (Figure 5C). A 150-bp fragment coding for orosomucoid was amplified (Figure 5D). Similarly, RT-PCR performed on RNA extracted from SKOV-3 epithelial carcinoma cells confirmed the expression of the orosomucoid (Figure 5E), further supporting the biochemical data. Finally, antibodies raised against the C-terminus of Reg alpha and a

monoclonal against orosomucoid were used for immunocytochemistry using the specific MALDI imaging procedure [28] (Figure 5F). Both biomarkers were detected using the

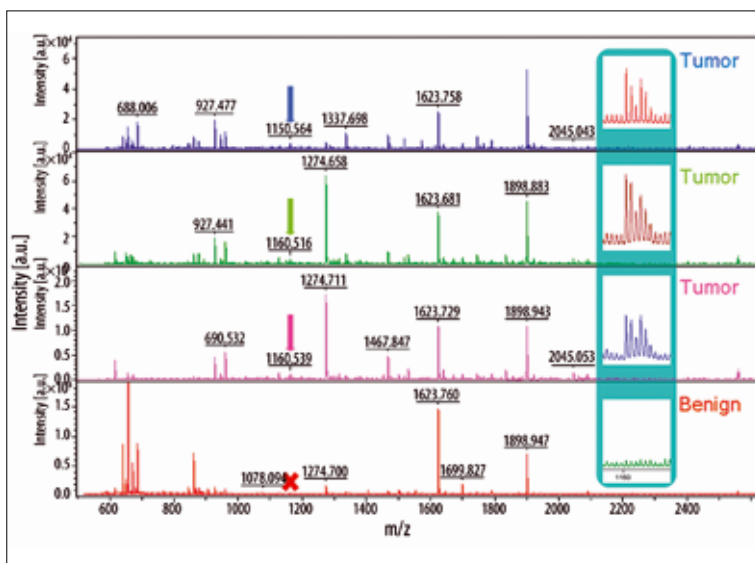


Figure 4. MALDI-MS profiles of 3 ovarian carcinomas after tissue trypsin digestion using an automatic micro-spotter (CHIP-1000, Shimadzu) versus benign tumor; a zoom of the peptide 1160.5 is performed. This peptide is present in 3 ovarian carcinomas and absent in the benign tumor. (Inset corresponds to the zoom of the 1160.5 region.)

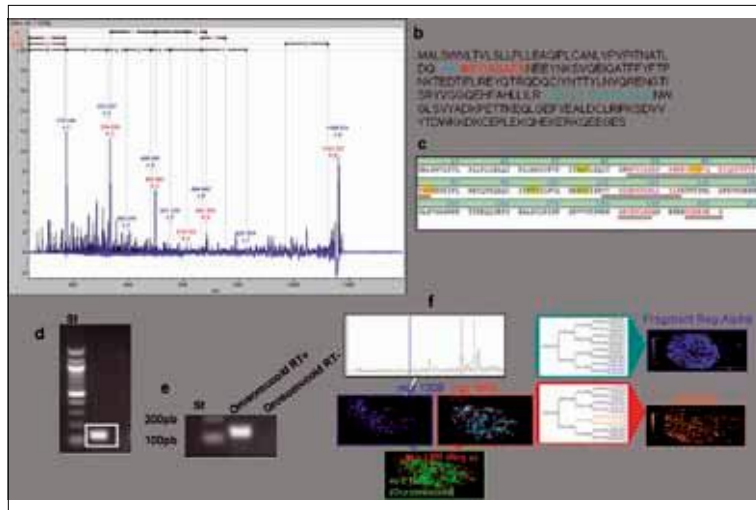


Figure 5. (A) MALDI MS/MS sequencing of 1160.5 using MALDI TOF-TOF. (B) Sequence (WFYIASAFR) in red corresponding to the fragment identified by MS-MS and localized in the orosomuroid-1 protein. (C) Sequence of the orosomuroid obtained by nano-LC-ITMS after trypsin digestion and by tissue MALDI TOF/TOF analyses. (D) RT-PCR amplification of orosomuroid from mRNA extracted biopsy (5 carcinoma versus 5 benign). (E) RT-PCR amplification of orosomuroid from SKOV-3 cell lines. (F) (a) MALDI specific imaging using the TAG-MASS concept with a polyclonal anti-Ct Reg alpha antibody tagged with a reporter (with a mass of 1309) and a monoclonal anti-orosomuroid tagged with another reporter (with a mass of 1569). (b) Merge of specific MALDI imaging molecular images of the C-terminal fragment of Reg alpha and orosomuroid. (c) MALDI imaging molecular images of the C-terminal fragment of Reg alpha and orosomuroid with the correspondence of the 2 subclass's location in the tumor part; each biomarker is characteristic of 1 region.

tag-mass procedure in the carcinoma region with specific localization (Figure 5Fb), which was consistent with the clustering distribution (Figure 5Fc).

A combination of MALDI TOF-TOF and nanoLC-IT MS/MS analyses (Table 3) allowed us to characterize 15 biomarkers (Table 3) from 20 samples (10 patients with ovarian cancer and absent in 10 benign tumors). Some of these have been previously reported as secreted proteins in large-scale analyses of human plasma from ovarian cancer patients [35], human ovarian cancer tumors [36] or ovarian ascites analyses [37]. Moreover, their location was determined by MSI using a bottom-up strategy. After tissue trypsin digestion, proteins were reconstructed based on their

in silico tryptic digested peptides detected on the digested tissue (Table 4, Figure 6). MALDI imaging mass spectrometry images from digested fragments for the same protein were cumulative and gave the molecular image of its

Table 3. Biomarkers identified by nanoLC-IT-MS in MS/MS mode from 10 patients with ovarian cancer absent in 10 benign tumors.

Access number	Protein name	Molecular mass	Mascot score (average)	Sequence coverage (average)
P08670_CHAIN_0	Vimentin	53651	89.6±22.3	27±10%
P51884_CHAIN_0	Lumican Precursor	38428	63.6±5.7	19.3±4%
P02647_CHAIN_1	Apolipoprotein 1	11183	49.9±4	21.6±4.9%
P51888_CHAIN_0	Prolargin	43809	52.5±0.7	17±0.8%
Q12889_CHAIN_0	Oviductin (mucin-9)	75372	47.8±1.3	13.3±1.2%
Q01995_CHAIN_0	Transgelin	22610	49.5±2.48	26±2.44%
P02765	Orosomuroid	23511	45±2.44	20.8±1.8%
P02787_CHAIN_0	Siderophilin	77049	38.1±2.2	12±4.8%
P01009_ISOFORM_2	Alpha 1 antiprotease	39066	29.8±1.6	21±3.2%
P08727	Cytokeratin 19	44635	29.3±1.75	10±1.6%
P30086_CHAIN_0	Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein	21056	28.1±0.9	23±2%
P31949	Protein S100 A11	11740	22.6±0.25	24.5±0.5%
P02790_CHAIN_0	Hemopexin	51676	21.0±0.4	6.5±1.2%
P07737_CHAIN_0	Profilin -1	15054	18.3±0.9	15.4±4.7%

Table 4. Trypsin digested fragment of proteins identified by NanoLC-IT-MS in MS/MS and found on tissue after bottom-up strategy and characterized by MS/MS.

Orosomucoide		Oviductal glycoprotein 1		Alpha anti-protease 1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1160.59	WFYIASAFR	1118.68	FIASVISLLR	1015.6	SVLQQLGITK
1559.83	ITGKWFYIASAFR	1120.6	LIMGIPTYGR	1110.59	LSITGTYDLK
1752.83	YVGGQEHFAHLLILR	1288.62	FTTMLSTFANR	1568.78	ECCGVFTDPKGIFK
		1248.54	SSAYAMNYWR		
		1508.77	TLLSIGGWNFGTSR		
Siderophilin		Reg alpha C-terminal		Profilin-1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1577.8	TAGWNIPMGLLYNK	1500.98	QLVHELDEAEYR	1643.9	TFVNITPAEVLVGVGK
		1518.2	IEDGNNFGVAV QEK	1470.7	SSFYVNGLTGGQK
Prolargin		Transgelin		Hemopexin	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1064.59	SFPNLA FIR	1204.7	TLMALGSLAVTK	1141.58	GGYTLVSGYPK
1309.7	LPGLVFLYMEK	1530.7	TDMFQTVDLFEGK	1120.599	NFSPVDAAFR
1352.71	NQLEEVPSALPR	1221.62	QMEQVAQFLK		
1549.856	NLMQENLAEMLR				
Vimentin		S100		Lumican	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1254.5	LGDLYEEEMR	1060.48	DGYNYTLSK	1178.63	LKEDAVSAAFK
1169.70	ILLAELEQLK	1849.89	TEFLSFMNTELAFTK	1024.55	FNALQYLR
1428.7	SLYASSPGGVYATR			1297.66	SLEDLQLTHNK
1533.84	KVESLQEEIAFLK			1180.65	RFNALQYLR
1570.88	ISLPLPNFSSSLNR				
Cytokeratin 19		Phosphatidylethanolamine-binding		Apolipoprotein 1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1064.09	SFPNLA FIR	1560.8	LYTLVLTDPDAPSR	1031.51	LSPLGEEMR
1365.7	SRLEQEIATYR	1632.79	NRPTSISWDGLDSGK	1301.64	THLAPYSDEL R
1389.67	AALEDTLAETEAR	1949.93	GNDISSGTVLSDYVVGSGPPK	1386.7	VSFLSALEEYTK
1586.83	LEHLYLNNNSIEK			1230.7	QGLLPVLESFK

tissue repartition. Interestingly, all the detected proteins have the same location.

discussion

These characterized proteins can be grouped into functional categories such as cell proliferation, immune response modulation, signaling to the cytoskeleton, and tumor progression.

Proteins associated with cell proliferation

The S100 protein family has been previously detected in aggressive ovarian tumors [16]. In our study, we detected S100 A11 (Table 3) and S100 A12 (PCA analyses) proteins in tumors. S100 A11 has already been detected in ovarian ascites [37]. S100 A11 (or calgizzarin) is known to regulate cell growth by inhibiting DNA synthesis [38,39]. S100 A12 is known to contribute to leukocyte migration in chronic inflammatory responses [40].

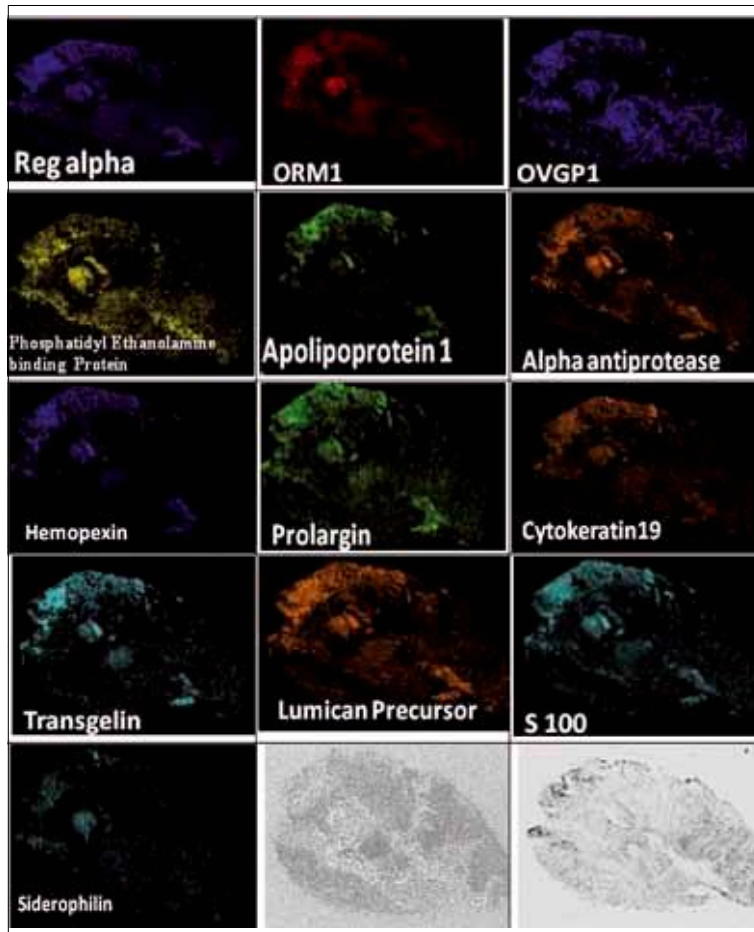


Figure 6. MALDI molecular images of the identified proteins by nanoLC-ITMS reconstructed on their tryptic digested fragment. Directly detected on tissue.

Proteins involved in immune response modulation

Recent studies have shown that ovarian cancer-associated ascites may provide an immunosuppressive environment [41]. In fact, a high CD4/CD8 ratio, which may indicate the presence of regulatory T-cells, is associated with poor outcomes. Reduced IL-2 and elevated IL-6 and IL-10 levels favor a Th2 inhibitory immune response. This immunosuppressive climate may explain the observation of non-responsiveness in ascites-derived T cells [41]. Considering these data, we tried to identify biomarkers from our pool that could be involved in such immunosuppression. In fact, we detected 5 factors involved in immune response modulation in our mucinous tumors: a C-terminal fragment of the 11S immunoproteasome (Reg-alpha), orosomucoid, apolipoprotein A1, hemopexin, and lumican.

PSME1 (proteasome activator complex subunit 1, 11S regulator complex [syn.: PA28 alpha]) cleaved into the Reg-alpha fragment could lead to default self-antigen presentation [20]. In fact, PA28 is a regulatory complex associated with 20S proteasome that consists of 3 subunits: alpha, beta, and gamma [42]. Binding of the 11S regulator complex to the 20S proteasome does not depend on ATP hydrolysis, and unlike the 19S regulatory subunit, the 11S regulator complex does not catalyze degradation of large proteins. Rather, it is responsible for MHC-class I antigen processing [43–45], which is greatly improved by interferon gamma-induced expression of the alpha and beta subunits [46].

Several viral proteins that interact with these proteasome subunits have been reported, and they may interfere with host anti-viral defenses, thereby contributing to cell transformation [47]. The manner in which they bind to the core particle via its subunits' C-terminal tails, and induce an a-ring conformational change to open the 20S gate, suggests a mechanism similar to that of the 19S particle [42]. No role in ovarian cancer has been demonstrated for the 11S regulator complexes. Our data demonstrate a high level of expression of PA28 in carcinomas, especially in epithelial cells. The PA28 activator belongs to the antigen processing machinery (APM). Its alteration by cleavage in ovarian carcinomas may be a mechanism to evade immune recognition. Such a hypothesis has already been proposed for the case of APM chaperones such as TAP, LMP2, LMP10, and tapasin in colon carcinoma, small cell lung carcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines. In fact, IFN-g treatment of these carcinoma cell lines corrects the TAP, LMP, and tapasin deficiencies and enhances PA28 a, LMP7, calnexin and calreticulin expression, which is accompanied by increased levels of MHC class I antigens [48]. Recently, PSEM2 (proteasome activator complex subunit 2, PA28 Beta) has also been detected in ascites fluid, which implicates it in immune cell tolerance toward carcinoma cells and confirms the dysregulation of self-antigen processing in ovarian tumors [37]. Moreover, PA28 alpha seems to be a target for Epstein-Barr virus (EBV) and herpes virus (HV), as we preliminary detected by qPCR (data not shown). In fact, Pudney and colleagues [49] have shown that, as EBV-infected cells move

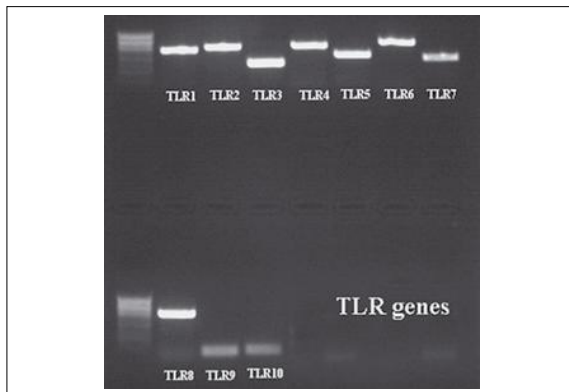


Figure 7. RT-PCR amplification of Toll-like receptors from SKOV-3 cell lines.

through the lytic cycle, their susceptibility to EBV-specific CD8⁺ T-cell recognition falls dramatically, concomitant with a reduction in transporter associated with antigen processing (TAP) function and surface human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) class I expression. Implication of virus in the cause of ovarian cancer is also sustained by the overexpression of furin enzyme (data not shown), which is known to be implicated in glycoprotein B cleavage through a motif R-X-K/R-R in both EBV and HV [50,51].

Among the 4 other factors that might participate in the tolerance phenomenon by inhibiting immune activation, the acute phase protein, orosomucoid (ORM, also known as alpha1-acid glycoprotein or AGP), is normally increased in infection, inflammation, and cancer, and it seems to have immunosuppressive properties in ovarian carcinoma ascites through inhibition of IL-2 secretion by lymphocytes [52]. Similarly, apolipoprotein A1 has been detected in conjunction with transthyretin and transferrin in early-stage mucinous tumors [53]. ApoA-I is known to decrease expression of surface molecules such as CD1a, CD80, CD86, and HLA-DR in dendritic cells, and it stimulates the production of IL-10 [54].

Interestingly, hemopexin has recently been demonstrated to reduce TNF and IL-6 from macrophages during inflammation, and it limits TLR4 and TLR2 agonist-induced macrophage cytokine production [55]. We demonstrate that in SKOV-3 epithelial ovarian carcinoma cells, all TLRs are overexpressed with the exception of TLR9 and TLR10 (Figure 7). This point is also in line with the overexpression of lumican, which is a small LRR proteoglycan in the extracellular matrix. Along with other proteoglycans, such as decorin, biglycan, and prolargin, lumican is known to be overexpressed in breast cancer and to play a role in tumor progression [56,57]. However, as demonstrated for biglycan, which interacts with TLR2/4 on macrophages [58,59], we speculate that lumican is also involved in the activation of the inflammasome through TLR2/4 interaction. The activation of all danger-sensing receptors in carcinoma cells can be explained by regulation of inflammation by carcinoma cells to facilitate tumor progression. It seems that ovarian cancer cells act as parasites and use molecular mimicry [60] to escape the immune response, and they produce immunosuppressors to achieve tolerance.

Signaling to the cytoskeleton

Several candidate proteins, including profilin-1, cofilin-1, vimentin, and cytokeratin 19 are involved in intracellular signaling to the cytoskeleton. Changes in cell phenotype, such as the conversion of epithelial cells to mesenchymal cells, are integral not only to embryonic development but also to cancer invasion and metastasis. Cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition (EMT) lose their epithelial morphology, reorganize their cytoskeleton, and acquire a motile phenotype through the up- and down-regulation of several molecules, including tight and adherent junction proteins and mesenchymal markers. TGF- β has been described to induce EMT in ovarian adenocarcinoma cells [61].

In the human lung adenocarcinoma cell line A549, this differentiation is accompanied by modification in the expression of several cytoskeleton proteins including β -actin, cofilin 1, moesin, filamin A and B, heat-shock protein β -1, transgelin-2, S100 A11, and calpactin. These changes presumably increase migratory and invasive abilities [62]. We recently demonstrated that treatment of the ovarian cancer cell line SKOV-3 with TGF- β (10 ng/mL, 24 h) increases the expression of cofilin and profilin-1 at mRNA and protein level, and modifies its cytoskeletal organization as assessed by confocal microscopy analysis [63]. After binding to its receptor, TGF- β stimulates the reorganization of the actin cytoskeleton and triggers the formation of stress fibers and cellular protrusions [63].

Tumor progression

In conjunction with S100 proteins and cytoskeleton modifying proteins, we also detected expression of oviduct-specific glycoprotein (OGP, Mucin-9), a marker of normal oviductal epithelium. Our data are in line with that of Woo and associates, who found that OGP is a tubal differentiation marker and may indicate early events in ovarian carcinogenesis [64,65].

Conclusions

In summary, PCA and clustering, performed after MALDI imaging, analysis allow molecular tissue classification and will be of great help for pathological diagnoses. We confirmed that biomarkers detected in our tissue samples such as orosomucoid and lumican are highly glycosylated, which is in line with the mucinous phenotype of ovarian cancers. Thus, clustering analysis in conjunction with specific biomarker detection can enhance tumor tissue classification and subclassification and lead to better diagnoses. Moreover, based on the biomarkers identified in this study, we propose that ovarian cancer cells act to suppress immune responses. These findings also suggest that ovarian cancer can have a viral cause. Viruses are known to orient the immune response to immunosuppression [66]. Further studies are now in progress to explore this possibility to consider as potential biomarkers for ovarian cancer diagnosis Reg alpha fragment, mucin-9 in conjunction with oncoviral proteins specific from EBV and HHV6 viruses

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AM performed NanoLC-ITMS and MALDI imaging analyses; DB: performed PCA analyses RL and CC: performed automatic profiling studies; JF design the new ionic matrices and on tissue bottom-up strategy for biomarker identification; DV performed the EMT studies; AT carried out the molecular studies; AD performed immunocytochemistry and Western blotting, DV realized the surgeries, and the follow-up of the study; AK and RD follow-up the study through the codirection of AM and DB theses; and IF and MS conceived of the study and participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

References:

- Lambaudie E, Collinet P, Vinatier D: [Ovarian cancers and CA 125 in 2006]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2006; 34: 254–57
- Edwards BK, Brown ML, Wingo PA et al: Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 2005; 97: 1407–27
- Ardekani AM, Liotta LA, Petricoin EF III: Clinical potential of proteomics in the diagnosis of ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2002; 2: 312–20
- Bandera CA, Tsui HW, Mok SC, Tsui FW: Expression of cytokines and receptors in normal, immortalized, and malignant ovarian epithelial cell lines. *Anticancer Res*, 2003; 23: 3151–57
- Conrads TP, Fusaro VA, Ross S et al: High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. *Endocr Relat Cancer*, 2004; 11: 163–78
- Conrads TP, Zhou M, Petricoin EF III et al: Cancer diagnosis using proteomic patterns. *Expert Rev Mol Diagn*, 2003; 3: 411–20
- Fields MM, Cheylen E: Ovarian cancer screening: a look at the evidence. *Clin J Oncol Nurs*, 2006; 10: 77–81
- Johann DJ Jr, McGuigan MD, Patel AR et al: Clinical proteomics and biomarker discovery. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1022: 295–305
- Kohn EC, Mills GB, Liotta L: Promising directions for the diagnosis and management of gynecological cancers. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003; 83(Suppl.1): 203–9
- Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF III, Liotta LA: Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer*, 2004; 40: 2604–12
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA et al: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 2002; 359: 572–77
- Bergen HR III, Vasmatazis G, Cliby WA et al: Discovery of ovarian cancer biomarkers in serum using NanoLC electrospray ionization TOF and FT-ICR mass spectrometry. *Dis Markers*, 2003; 19: 239–49
- Diamandis EP: Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet*, 2002; 360: 170; author reply 171
- Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, Beijnen JH: Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci*, 2006; 27: 251–59
- Fung ET, Yip TT, Lomas L et al: Classification of cancer types by measuring variants of host response proteins using SELDI serum assays. *Int J Cancer*, 2005; 115: 783–89
- Kikuchi N, Horiuchi A, Osada R et al: Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci*, 2006; 97: 1061–69
- Rai AJ, Zhang Z, Rosenzweig J et al: Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med*, 2002; 126: 1518–26
- Xiao Z, Prieto D, Conrads TP et al: Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol*, 2005; 230: 95–106
- Zhu Y, Wu R, Sangha N et al: Classifications of ovarian cancer tissues by proteomic patterns. *Proteomics*, 2006; 6: 5846–56
- Lemaire R, Menguellet SA, Stauber J et al: Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovarian cancer biomarker. *J Proteome Res*, 2007; 6: 4127–34
- Deininger SO, Ebert MP, Futterer A et al: MALDI Imaging Combined with Hierarchical Clustering as a New Tool for the Interpretation of Complex Human Cancers. *J Proteome Res*, 2008
- Walch A, Rauser S, Deininger SO, Hofler H: MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol*, 2008; 130: 421–34
- Lemaire R, Wiszorski M, Desmons A et al: MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem*, 2006; 78: 7145–53
- Franck J LR, Wiszorski M, Van Remoortere A et al: MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30000 Da. *Anal Chem*, 2010; In press
- Holle A, Haase A, Kayser M, Hohendorf J: Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. *J Mass Spectrom*, 2006; 41: 705–16
- Fournier I, Lemaire R, Wiszorski M et al: New insight in sample preparation for MALDI imaging and new developments to approach specific MALDI imaging of the transcriptome. *Proceedings of 54th ASMS conference on Mass Spectrometry*, Seattle, Washington, May 30–June 2 2006
- Stauber J, Lemaire R, Wiszorski M et al: New developments in MALDI imaging mass spectrometry for pathological proteomic studies; Introduction to a novel concept, the specific MALDI imaging. *Mol Cell Proteomics*, 2006; 5: S247–S49
- Lemaire R, Stauber J, Wiszorski M et al: Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag. *J Proteome Res*, 2007; 6: 2057–67
- Krug A, Towarowski A, Britsch S et al: Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*, 2001; 31: 3026–37
- Franck J, Arafah K, Barnes A et al: Improving tissue preparation for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. Part 1: using microspotting. *Anal Chem*, 2009; 81: 8193–202
- Lemaire R, Tabet JC, Ducoroy P et al: Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem*, 2006; 78: 809–19
- Franck J, Longuespée R, Wiszorski M et al: MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30000 Da. *MedSci Monit*, 2009; In press
- Franck J, Arafah K, Elayed M et al: MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2009; 8: 2023–33
- Hibbs K, Skubitz KM, Pambuccian SE et al: Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol*, 2004; 165: 397–414
- Schweigert FJ: Characterisation of protein microheterogeneity and protein complexes using on-chip immunoaffinity purification-mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2005; 4: 7–15
- Bengtsson S, Krogh M, Szigartyo CA et al: Large-scale proteomics analysis of human ovarian cancer for biomarkers. *J Proteome Res*, 2007; 6: 1440–50
- Gortzak-Uzan L, Ignatchenko A, Evangelou AI et al: A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res*, 2008; 7: 339–51
- Makino E, Sakaguchi M, Iwatsuki K, Huh NH: Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death. *J Mol Med*, 2004; 82: 612–20
- Sakaguchi M, Miyazaki M, Sonegawa H et al: PKCalpha mediates TGFbeta-induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *J Cell Biol*, 2004; 164: 979–84
- Yang Z, Tao T, Raftery MJ et al: Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol*, 2001; 69: 986–94
- Giuntoli RL II, Webb TJ, Zoso A et al: Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for anti-tumor immunity. *Anticancer Res*, 2009; 29: 2875–84
- Yang Y, Fruh K, Ahn K, Peterson PA: *In vivo* assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem*, 1995; 270: 27687–94
- Kloetzel PM: The proteasome system: a neglected tool for improvement of novel therapeutic strategies? *Gene Ther*, 1998; 5: 1297–98
- Rivett AJ, Gardner RC: Proteasome inhibitors: from *in vitro* uses to clinical trials. *J Pept Sci*, 2000; 6: 478–88

45. Rotem-Yehudar R, Groettrup M, Soza A et al: LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med*, 1996; 183: 499–514
46. Kuckelkorn U, Ruppert T, Strehl B et al: Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med*, 2002; 195: 983–90
47. Regad T, Saib A, Lallemand-Breitenbach V et al: PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J*, 2001; 20: 3495–505
48. Delp K, Momburg F, Hilmes C et al: Functional deficiencies of components of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant*, 2000; 25(Suppl.2): S88–95
49. Pudney VA, Leese AM, Rickinson AB, Hislop AD: CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med*, 2005; 201: 349–60
50. Sorem J, Jardetzky TS, Longnecker R: Cleavage and secretion of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 promote membrane fusion with B lymphocytes. *J Virol*, 2009; 83: 6664–72
51. Sorem J, Longnecker R: Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *J Gen Virol*, 2009; 90: 591–95
52. Elg SA, Mayer AR, Carson LF et al: Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovaria carcinoma. *Cancer*, 1997; 80: 1448–56
53. Nosov V, Su F, Amneus M et al: Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 2009; 200: 639 e1–5
54. Kim KD, Lim HY, Lee HG et al: Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 338: 1126–36
55. Liang X, Lin T, Sun G et al: Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. *J Leukoc Biol*, 2009; 86: 229–35
56. Leygue E, Snell L, Dotzlaw H et al: Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Res*, 1998; 58: 1348–52
57. Leygue E, Snell L, Dotzlaw H et al: Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J Pathol*, 2000; 192: 313–20
58. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W et al: Biglycan: A danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem*, 2009
59. Schaefer L, Babelova A, Kiss E et al: The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*, 2005; 115: 2223–33
60. Salzet M, Capron A, Stefano GB: Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitol Today*, 2000; 16: 536–40
61. Kitagawa K, Murata A, Matsuura N et al: Epithelial-mesenchymal transition of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor-beta1. *Int J Cancer*, 1996; 66: 91–97
62. Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS et al: Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype. *J Proteome Res*, 2006; 5: 1143–54
63. Vergara D, Merlot B, Lucot JP et al: Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett*, 2010; 291: 59–66
64. Woo MM, Alkushi A, Verhage HG et al: Gain of OGP, an estrogen-regulated oviduct-specific glycoprotein, is associated with the development of endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 7958–64
65. Woo MM, Gilks CB, Verhage HG et al: Oviductal glycoprotein, a new differentiation-based indicator present in early ovarian epithelial neoplasia and cortical inclusion cysts. *Gynecol Oncol*, 2004; 93: 315–19
66. Wahl A, McCoy W, Schafer F et al: T Cell Tolerance for Variability in a Class I HLA Presented Influenza A Virus Epitope. *J Virol*, 2009
67. Begum FD, Hogdall CK, Kjaer SK et al: The prognostic value of plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in stage III ovarian cancer patients. *Anticancer Res*, 2004; 24: 1981–85
68. Deng X, Hogdall EV, Hogdall CK et al: The prognostic value of pretherapeutic tetranectin and CA-125 in patients with relapse of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2000; 79: 416–19
69. Hogdall EV, Hogdall CK, Tingulstad S et al: Predictive values of serum tumour markers tetranectin, OVX1, CASA and CA125 in patients with a pelvic mass. *Int J Cancer*, 2000; 89: 519–23
70. Lundstrom MS, Hogdall CK, Nielsen AL, Nyholm HC: Serum tetranectin and CA125 in endometrial adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 2000; 20: 3903–6
71. Lim R, Ahmed N, Borregaard N et al: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition. *Int J Cancer*, 2007; 120: 2426–34
72. Gericke B, Raila J, Sehouli J et al: Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients. *BMC Cancer*, 2005; 5: 133
73. Rauvala M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T: Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. *Gynecol Oncol*, 2005; 99: 656–63
74. Diamandis EP, Borgono CA, Scorilas A et al: Immunofluorometric quantification of human kallikrein 5 expression in ovarian cancer cytosols and its association with unfavorable patient prognosis. *Tumour Biol*, 2003; 24: 299–309
75. Pedersen N, Schmitt M, Ronne E et al: A ligand-free, soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer. *J Clin Invest*, 1993; 92: 2160–67
76. Sier CF, Stephens R, Bizik J et al: The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients. *Cancer Res*, 1998; 58: 1843–49

Article 4

Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer

David Bonnel & Rémi Longuespée & Julien Franck & Morad Roudbaraki & Pierre Gosset & Robert Day & Michel Salzet & Isabelle Fournier

Received: 16 March 2011 / Revised: 12 April 2011 / Accepted: 12 April 2011
Springer-Verlag 2011

Abstract The large amount of data generated using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI) poses a challenge for data analysis. In fact, generally about 1.10^8 – 1.10^9 values (m/z , I) are stored after a single MALDI-MSI experiment. This imposes processing techniques using dedicated informatics tools to be used since manual data interpretation is excluded. This

work proposes and summarizes an approach that utilizes a multivariable analysis of MSI data. The multivariate analysis, such as principal component analysis–symbolic discriminant analysis, can remove and highlight specific m/z from the spectra in a specific region of interest. This approach facilitates data processing and provides better reproducibility, and thus, broadband acquisition for MALDI-MSI should be considered an effective tool to highlight biomarkers of interest. Additionally, we demonstrate the importance of the hierarchical classification of biomarkers by analyzing studies of clusters obtained either from digested or undigested tissues and using bottom-up and in-source decay strategies for in-tissue protein identification. This provides the possibility for the rapid identification of specific markers from different histological samples and their direct localization in tissues. We present an example from a prostate cancer study using formalin-fixed paraffin-embedded tissue.

Published in the special issue MALDI Imaging with Guest Editor Olivier Laprévotte.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-011-5020-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Bonnel · R. Longuespée · J. Franck · M. Salzet (*) · I. Fournier
MALDI Imaging team, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée (FABMS), EA 4550, Université Nord de France, Université Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France
e-mail: Michel.salzet@univ-lille1.fr

D. Bonnel · R. Longuespée · R. Day
Institut de pharmacologie de Sherbrooke, Faculté de médecine et des Sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

M. Roudbaraki
INSERM, U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Université Nord de France, Université Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

P. Gosset
Faculté Libre de Médecine, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, 59000 Lille, France

Keywords MALDI mass spectrometry imaging · Principal component analysis · Symbolic discriminant analysis · Hierarchical clustering · Bottom-up · In-source decay · Biomarkers · Prostate cancer

Introduction

Thirteen years after its original publication [1], matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI) has become a commonly utilized tool for imaging endogenous biomolecules [2–5] and exogenous compounds [6–9] from a diverse array of tissue types. Since then, many improvements in MALDI-MSI performance have been achieved, including improvements

related to tissue preparation [10–12], data processing and imaging software [13, 14], and spatial resolution [15, 16]. Biomarker discovery and identification has been a field of intense research over the past 10 years, and MALDI-MSI has been proven to provide an interesting and promising strategy for such investigations [17–26]. However, large amounts of data are generated from imaging, and the manual determination of fine variations in marker regulation has become an impossible task with respect to the number of spectra generated (position-rastered) for a single image (frequently 20,000–40,000 pixels) and the number of images required to obtain a statistical overview that accounts for the sample variability between different experiments for a specific tissue and the intrinsic variability between tissues from different organisms. Moreover, each MS spectrum is composed of a large number of points (couple (m/z, I)), i.e., in general, a hundred thousand m/z values with their corresponding intensity. All together, this corresponds to about 10^8 – 10^9 m/z values and corresponding intensities for a unique image. Therefore, an understanding of the fine regulation of biomolecules to highlight markers of a specific physiological stage or cell phenotype requires the use of bioinformatics tools for fast and reliable analyses.

Multivariate statistics is a form of statistics that simultaneously encompasses the observation and analysis of more than one statistical variable. Methods of bivariate statistics, for example, ANOVA and t tests, are special cases of multivariate statistics that involve two variables. There are several other types of multivariate analyses that are divided into two groups: descriptive methods and explorative methods. Descriptive methods include principal component analysis (PCA), factor analysis of correspondence, multiple correspondence analysis and classification methods such as hierarchical clustering. Explorative methods include multiple regression, discriminatory analysis and segmentation.

Considering the large amounts of data that are analyzed using the MALDI-MSI approach, data reduction and multivariable analysis has become a necessity in facilitating extraction of the information of interest. Among the different multivariable analytical tools that can be used for this purpose, PCA has been proven to provide an interesting method for automatic feature extraction [27]. Several studies have posited arguments that multivariable analysis though PCA is a good approach for this purpose and can be used with MALDI-MSI for pathological disease applications [18, 19, 28–30]. However, some limitations are associated with the use of PCA. These limitations encompass different factors, such as data analysis complications. In fact, many spectra can be similar for one principal component, whereas they can differ for another principal component, and thus, it is difficult to define the best data

representation. This problem can be resolved by linking hierarchical clustering directly to PCA [18, 19, 28, 29].

In this paper, we developed a strategy, designated principal component analysis–symbolic discriminant analysis (PCA-SDA), to facilitate the identification of biomarkers. This concept of data mining was also applied to data sets generated for identification. In fact, protein identification using direct imaging strategies has been shown to be possible either by enzymatic digestion using tissue bottom-up approaches [10, 31, 32] or by in-source decay (ISD) with top-down approaches [33]. Such strategies also produce large quantity of data, and markers of interest may be masked within the forest of non-relevant data. Here, we explored the use of PCA-SDA analysis with data generated using both bottom-up and ISD. Finally, the strategy was applied to a biologically relevant case, namely prostate cancer, using samples from hospital libraries, i.e., formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues.

Experimental procedure

Materials

Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapinic acid, trifluoroacetic acid (TFA), ethanol (EtOH), acetonitrile (ACN), chloroform, aniline (ANI), (N-succinimidyl)oxycarbonylmethyltris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide (TMPP), water CHROMASOLV PLUS for HPLC (H₂O) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Sequencing-grade-modified trypsin, porcine enzyme was from Promega (Charbonnières-les-Bains, France)

Tissue preparation and treatment

Frozen tissues

Adult male Wistar rats weighing 250–350 g (animal use accreditation provided by the French ministry of agriculture No. 04860) and maintained under standard care were used. Animals were sacrificed by suffocation under CO₂ and immediately dissected to remove the brain. Tissue sections (10 µm) were obtained from frozen rat brains tissues using a Leica CM1510S cryostat (Leica Microsystems, Nanterre, France) and applied to ITO-coated conductive glass slides (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Tissues were then submitted to washing procedures prior to matrix application for improved detection of peptides/proteins. Washing was performed by two washing steps using first washing with cold 95% EtOH for 15 s followed by a washing step with chloroform for 1 min according to previously published protocols [11, 34].

FFPE tissues

Prostate tissue specimens Prostate tissue specimens were obtained from patients undergoing radical prostatectomy for clinically localized prostate carcinoma. All patients gave informed consent according to a protocol approved by the Internal Review Board for research involving human subjects at Saint Philibert Hospital. All experiments involving patient tissues were carried out under approval number CP 01/33, issued by the Consultative Committee on Persons Protection in the Biomedical Research of Lille. None of the patients had any treatment for prostate cancer before surgery. Prostate tissues were fixed by placing the samples (2.5 cm×2 cm) for 24–48 h in neutral 3.7% (w/v) formalin solution, rinsed in PBS buffer and then were paraffin-embedded which allows tissues to be cut into thin (i.e., a few micrometers) sections. For MALDI imaging experiments, 10- μ m-thick tissue sections were cut from the FFPE whole-mount prostate tissue block, placed on the ITO-coated slides, and heated for 60 min at 58 °C. The paraffin was then removed by submerging the glass slide in toluene two times for 5 min, followed by a light rehydration in ethanol (100, 96; 70, and 30 °C) baths before drying in a dessicator at room temperature. Tissue was also counter-stained with Mayer's hematoxylin, dehydrated through graded ethanol solutions, and air-dried for the histological examinations by the anatomopathologists. According to the anatomopathology examinations, the tissues appeared heterogeneous and contained cancer, hyperplasiae, and normal regions in addition to stromal tissues in each region.

Antigen retrieval Antigen retrieval (AR) process was performed to unmask proteins and ease access of the enzyme to its specific cleavage sites. Here, AR was performed using citric acid or so-called citric acid antigen retrieval (CAAR). CAAR was performed by immersing the slides in 10 mM of citric acid for 20 min at 90 °C and then drying them in a dessicator for 10 min. Prior to the enzymatic digestion, the slides were incubated in 10 mM NH_4HCO_3 two times to remove the remaining AR solution and to condition the tissue for good enzyme activity.

Enzymatic digestion

Automatic trypsin digestions were performed using a high position accuracy chemical inkjet printer (CHIP-1000, Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan) [10]. The printed array of the CHIP-1000 on the tissue section comprised spots spaced 250 μ m center-to-center. A total of 20 nL of a solution containing 25 μ g/mL of trypsin in pure H_2O was applied to each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited on each spot per cycle. Thus, 40 iterations

were necessary to obtain the final volume. The tissue sections were then incubated at 37 °C for 2 h in a box with an atmosphere of saturated $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) to avoid drying the enzyme droplets.

N-terminal derivatization

Automatic TMPP derivatization was performed using the automatic microspotting device [10]. A CHIP-1000 was used to deposit TMPP on the tryptic spots according to the procedure that has been previously described for trypsin digestion. A total of 10 nL of solution containing 1 mg/mL of TMPP in $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (3:7, v/v) was deposited on each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited on each spot per cycle. Thus, 20 iterations were necessary to obtain the final volume for each spot. A solution of $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ containing 1% TEA was then spotted, thus initiating the derivatization reaction. The automated microspotting was performed either according to a global square area of points or by dividing this area into smaller squares, with each including ten-by-ten spots to increase the reaction yield [10].

MALDI-MSI

Depending on whether the bottom-up or the ISD approaches were used, solutions specific for the matrices were deposited using the CHIP-1000 printer [10] or the ImagePrep sprayer.

Bottom-up approach

A solid ionic matrix CHCA/aniline was used as the matrix to image peptides and was prepared according to a previously established procedure [35].

Matrix microspotting Forty nanoliters of ionic matrix solution containing 10 mg/mL of CHCA, and 7.2 μ L of aniline in 0.1% ACN/TFA (6:4, v/v) was spotted on each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited on each spot per cycle. Thus, 20 iterations were necessary to reach the total final volume.

Matrix micro-spraying Five milliliters of a solution containing 10 mg/mL of the matrix CHCA/aniline in 0.1% ACN/TFA (3:2, v/v) was prepared. The matrix was deposited on the tissue section with the ImagePrep automatic sprayer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), which creates an aerosol via vibrational vaporization and allows one to monitor the different stages of matrix deposition, i.e., extraction, drying and matrix layer thickness. Indeed, the method used to spray CHCA/aniline included an initialization phase to deposit the first

layer of the matrix on the slide. This process was followed by phases that permitted partial moisturization over several cycles of the tissue section before it had dried completely. The methods and parameters set-up are given in Table 1.

MS/MS identification in using bottom-up strategies MS/MS experiments on digested tissue were performed using the UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument equipped with LIFT III cell using FlexAnalysis 3.0. For MS/MS experiments, parameters were set as follow: laser repetition rate was 100 Hz, ion source voltages were, respectively, 8 and 7.3 kV on MALDI sample plate and first electrode; LIFT cell was pulsed from ground for electrodes 1 and 2 to 19 kV and in the last step, electrode 3 was decreased to 3.2 kV; reflector end voltage was set to 29.5 kV and mid-grid to 13.85 kV. For each MS/MS spectrum, 10,000 total shots were averaged including 1,000 for parent ions and 9,000 for fragments. Laser fluence was increased over the experiments for generating lower m/z fragments.

Data analysis Protein identification in databanks were performed using Biotoools 3.0 (Build 1.88) software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) connected to Mascot 2.2.0.3 search engine and interrogating the Swiss-Prot Protein Knowledgebase Release 56.1 of 02-Sep-2008 (397,539 sequence entries, comprising 143,289,088 amino acids abstracted from 172,934 references) with oxidation as variable modification and no fixed modification. Taxonomy was specified to be human. Trypsin was selected as enzyme and one missed cleavages were selected. The mass tolerance was set at 0.4 and 0.4 Da, respectively, for the MS and MS/MS.

In-source decay approach

The 1,5-diaminonaphthalene (1,5-DAN)/camphor was used as the ionic matrix to image ISD fragments of proteins. It was prepared by adding 1 eqM of cyclic terpenoid camphor to 5 mg/mL 1,5-DAN in 2% ACN/TFA0 (1:1, v/v).

Matrix microspotting Twenty nanoliters of a solution containing 5 mg/mL of the matrix 1,5-DAN/camphor in 0.2% ACN/TFA(1:1, v/v) was deposited on an array of spots that were 100 μ m in size and spaced 200 μ m in a hemi rat brain section, using a chemical inkjet printer CHIP 1000 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Matrix micro-spraying Matrix micro-spraying for ISD was performed following the same protocol as described for MALDI-MSI and using 5 mL of a solution containing 5 mg/mL of the solid ionic matrix 1,5-DAN/camphor in ACN/TFA 0.2% (1:1 v/v).

Image acquisition Images were acquired using the UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument. Imaging was performed in the positive reflectron mode, and MALDI-MS spectra were acquired in the m/z range from 550 to 5,000. A total of 300 spectra were acquired for each spot at a laser frequency of 100 Hz. The images were recorded and reconstructed using Fleximaging 2.1 software.

Statistical analysis The data set obtained with Fleximaging v2.1 software (Bruker Daltonics, Bremen) was loaded in the soft ClinProTools v2.2 (Bruker Daltonics, Bremen) to conduct a principal component analysis and hierarchical clustering of the data. The unsupervised method was selected for the PCA after standardization of the data. Thus, PC1 and PC2 were found to have the largest variance. After the hierarchical clustering, the same data were exported to the image in Fleximaging 2.1 to view areas with different profiles.

Results and discussion

Determining specific markers of a physiological stage or cell phenotype using MALDI-MSI requires the use of data processing and data analysis using multivariable analytical bioinformatics tools. The most widely used multivariable analysis is PCA. PCA provides access to m/z, which

Table 1 Vibrational micro-sprayer method used for matrix deposition giving method parameters used for the experiments including sensor control final voltage, number of cycles, spray time, incubation time and dry mode

	Sensor control: final voltage difference	Number of cycles	Spray time	Incubation time	Dry mode
Phase1: Initialization	0.65 V	5 to 20	2.5 s	10 s	90 s
Phase2	0.1 V	2 to 10	2 s	30 s \pm 30 s	60 s
Phase3	0.2 V	4 to 12	1 s	30 s \pm 30 s	Residual wetness
Phase4	0.3 V	3 to 30	1 s	30 s \pm 30 s	Residual wetness
Phase5	0.6 V	4 to 64	1 s	30 s \pm 30 s	Residual wetness

demonstrates differences between or within samples. PCA is often combined with hierarchical clustering (HC), because HC classifies the mass spectra according to similarities between their profiles and thus provides the ability to highlight regions containing differences in molecular content. Figure 1 describes the general application of the analytical workflow to MALDI-MSI data sets.

The first approach of MALDI-MSI data sets is based on the supervised or non-supervised PCA mode, which allows the detection of m/z that demonstrate important variations within the tissue. PCA is conducted using Pareto scaling, which uses the square root of the standard deviation as a scaling factor to reduce the dominance of large-scale intensity changes in the matrix and other high-abundance ions, which may mask the variation in lower abundance ions during PCA. The overall outcome of the PCA is greatly affected by the ability of ions related to the matrix coating and other endogenous molecules to mask the underlying, relevant information. For the unsupervised PCA, each spectrum is classified individually. Thus, the selected PCs account for the greatest separation of each individual spectrum. At the top of each, the scores and loading plots are shown. In the second approach, we propose the use of hierarchical clustering (Fig. 1) as an initial step to identify major spectral difference between each histological type. This method determines the discriminatory signals and builds functions using these signals that distinguish sample populations based on their classification. Peak lists from MALDI spectra, which were obtained using data processing software (Flex Analysis v3.0 and Flex Control v2.5), were used for the statistical analyses and were clustered by similarity discrimination based on presence vs. absence as criteria. Statistical analyses were conducted using PCA with ClinProTools

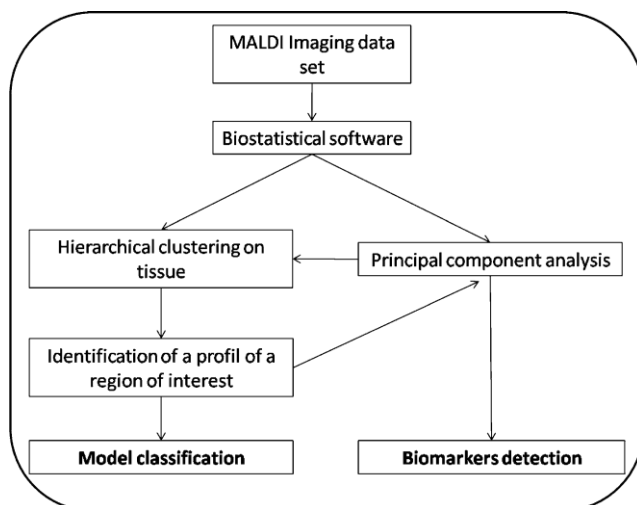


Fig. 1 General workflow to search for biomarkers and model classification by MALDI-MSI

v2.2 software. In this case, the mass spectra were internally recalibrated on common peaks (also known as a spectral alignment) and normalized to the total ion count. An average spectrum created from all of the individual spectra was used to perform peak selection and to define the integration ranges. The integration ranges were used to determine intensities or areas of single spectra. The signal intensities were used for all calculations. For PCA and HC, the individual peak intensities were standardized across the database.

PCA-SDA based on hierarchical clustering for biomarker identification

PCA-SDA based on HC was first tested using the data sets from an image generated from a rat brain tissue section under analytical conditions to detect peptides and small proteins. Following MALDI imaging acquisition, the data were loaded in the analytical software for HC (Fig. 2). HC was prepared using a Euclidean distance method and a ward linkage method based on the PCA results previously obtained. The dimensions were reduced to 85% of the explained variance. A dendrogram was then obtained (Fig. 2A), which could be translated into a molecular image by allocating a specific color plot to each of the different clusters of the HC dendrogram, as presented in Fig. 2B. The molecular image generated from the HC results could be

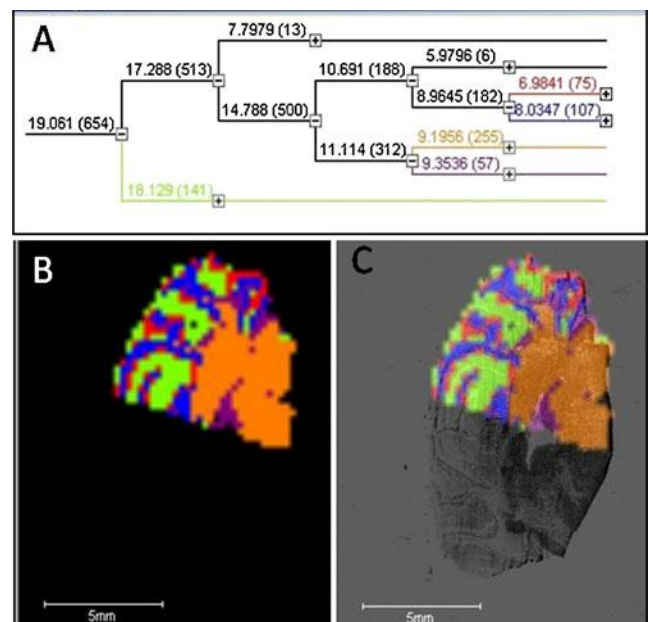


Fig. 2 Hierarchical clustering applied to a frozen rat brain MALDI image. Colors correspond to the different clusters found in the dendrogram. A Dendrogram obtained from the image data set. B Image representation of clusters of the spectra generated by hierarchical clustering based on the PCA results. C Superposition of the clustering on the rat brain tissue section optical image

superimposed on the optical image of the tissue section (Fig. 2C) and showed a clear correlation of the different clusters to the histological tissue types. Each group of spectra delimitating a cluster differed from other groups based on spectral profiles convergence for classified in the same cluster and divergence for spectra classified in different clusters (Fig. 2B). This is a good method to define regions corresponding to various cell phenotypes and subsequently markers of these specific phenotypes. We, therefore, used HC to define our regions of interest (ROI's). To exemplify this, we created a ROI (Fig. 3) in the rat brain section for the fourth ventricle. Here, we choose to enclose in the ROI a slightly larger area than the fourth ventricle to include spectra with different profiles for serving as negative controls (Fig. 3A). Spectra for this region were then selectively loaded for PCA multivariate analysis (Fig. 3B). After PCA analysis, the PC1 versus PC2 loading

was performed to compare m/z that were differentially detected in the selected ROI because PC1/PC2 provided the best discrimination. Several different ions presented a high level of discrimination along the PC1 axis. To perform a study case, two ions with a high level of discrimination and that presented a very different distribution within the tissue sections were selected: ions at m/z 2,030 and m/z 2,793. As demonstrated by the superimposition of the MALDI images of these ions onto the optical image of the tissue section (Fig. 3C and D), these ions had a very different distribution. In fact, m/z 2,030 was specific to the fourth ventricle (Fig. 3C), whereas m/z 2,793 (Fig. 3D) demonstrated a relatively large distribution within the tissue section that corresponded to other morphological structures in the tissue. m/z 2793 was absent in the fourth ventricle but present in the area obtained from the ROI around the structure, which served as a negative control. The MALDI-

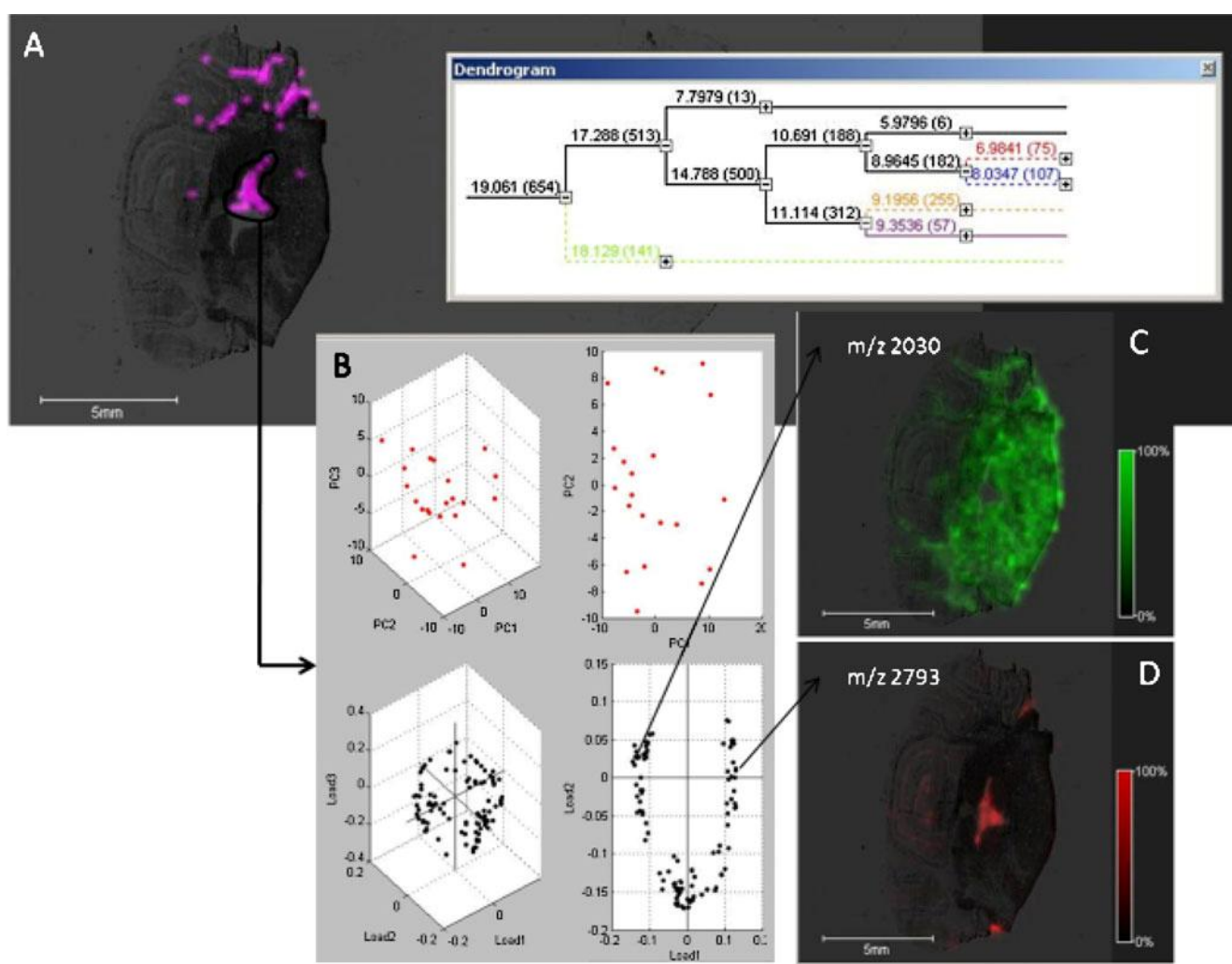


Fig. 3 Selection of a cluster representing the ROI. A The spectra for this region were loaded for a new PCA analysis to provide the different m/z variations. B Examples of images at m/z with different

distributions, as demonstrated by the PCA analysis. C–D Images of the distributions at m/z 2030 and m/z 2793, respectively

superimposed on the optical image of the tissue section (Fig. 2C) and showed a clear correlation of the different clusters to the histological tissue types. Each group of spectra delimitating a cluster differed from other groups based on spectral profiles convergence for classified in the same cluster and divergence for spectra classified in different clusters (Fig. 2B). This is a good method to define regions corresponding to various cell phenotypes and subsequently markers of these specific phenotypes. We, therefore, used HC to define our regions of interest (ROI's). To exemplify this, we created a ROI (Fig. 3) in the rat brain section for the fourth ventricle. Here, we choose to enclose in the ROI a slightly larger area than the fourth ventricle to include spectra with different profiles for serving as negative controls (Fig. 3A). Spectra for this region were then selectively loaded for PCA multivariate analysis (Fig. 3B). After PCA analysis, the PC1 versus PC2 loading

was performed to compare m/z that were differentially detected in the selected ROI because PC1/PC2 provided the best discrimination. Several different ions presented a high level of discrimination along the PC1 axis. To perform a study case, two ions with a high level of discrimination and that presented a very different distribution within the tissue sections were selected: ions at m/z 2,030 and m/z 2,793. As demonstrated by the superimposition of the MALDI images of these ions onto the optical image of the tissue section (Fig. 3C and D), these ions had a very different distribution. In fact, m/z 2,030 was specific to the fourth ventricle (Fig. 3C), whereas m/z 2,793 (Fig. 3D) demonstrated a relatively large distribution within the tissue section that corresponded to other morphological structures in the tissue. m/z 2793 was absent in the fourth ventricle but present in the area obtained from the ROI around the structure, which served as a negative control. The MALDI-

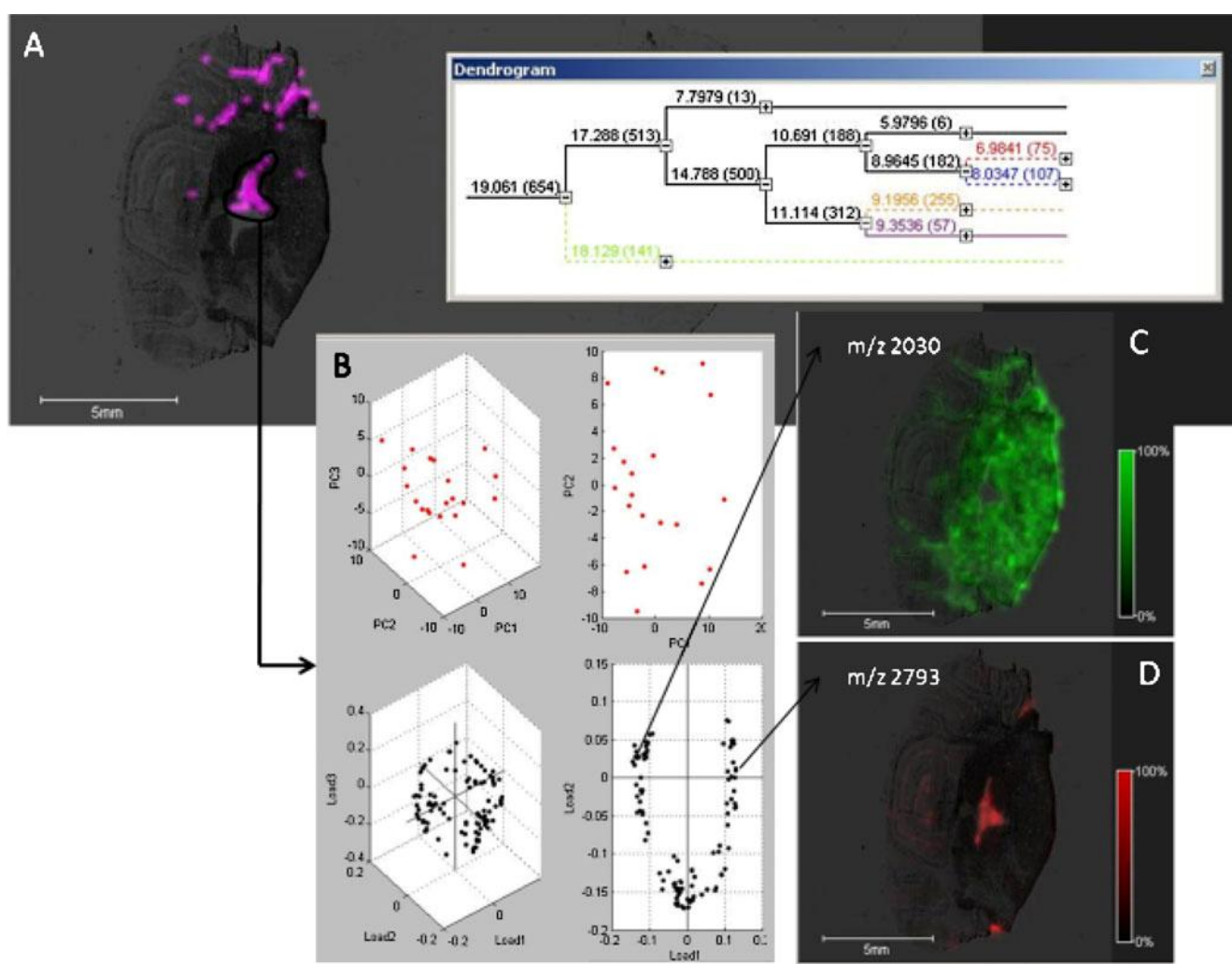


Fig. 3 Selection of a cluster representing the ROI. A The spectra for this region were loaded for a new PCA analysis to provide the different m/z variations. B Examples of images at m/z with different

distributions, as demonstrated by the PCA analysis. C–D Images of the distributions at m/z 2030 and m/z 2793, respectively

MSI results are usually obtained from the average mass spectrum, which is reconstructed from all of the spectra recorded during the image acquisition using the software. Therefore, by using such a representation of the data, the m/z present in a small region (i.e., in a few spectra) are not properly represented in the average mass spectrum, even if they are very intense. This lack of information is exemplified by the signal at m/z 2,793, is not observed in the average mass spectrum (Fig. 4A) and precludes the reconstruction of an image. However, as shown in Fig. 4B, it was possible to detect this ion specifically in the fourth ventricle using the PCA-SDA analytical approach described herein (Fig. 4C), which is in contrast to other regions (Fig. 4D).

Thus, without the PCA-SDA approach, it would not have been possible to detect the presence of this marker, which is highly specific to the 4th ventricle. This shows that PCA-SDA facilitates the direct tracking of specific markers in an ROI defined by the HC analysis. As compared to other proteomic techniques, this will greatly affect the MSI. In fact, the great potential of MSI coupled with PCA-SDA is reflected by the ability to quickly detect specific markers that are present in a pathological region or in regions containing cells with diverse phenotypes while conserving their spatio-temporal localization in the tissue. These signals would be diluted using classical proteomic strategies in which whole organs are used for extraction. For all experiments performed on rat brains, biological material was easily accessible and these experiments were performed in triplicate from adjacent tissue section from the same tissue block and from five different brain tissues from different animals. Similar results were obtained from the multivariate analysis approach from the different experiments. However, only some examples on various tissues are presented here. The next step is the identification of the detected markers in tissues. Therefore, we were interested in testing the PCA-SDA strategy using data generated from identification strategies.

Bottom-up approach

The bottom-up strategy was the first technique explored for on-tissue protein identification [10, 32, 35, 36]. This is explained principally based on two factors: it is difficult to use a proper top-down analysis with ion selection on MALDI instruments, and archived clinical samples (FFPE) cannot be used for MSI without a digestion step [35, 37, 38]. Therefore, marker screening from a classical MSI sequence is performed. However, bottom-up and classical approaches have been shown to lead to complementary data with proteins specifically observed in one strategy. Moreover, marker screening for archived FFPE samples can only be performed using digestion data. Therefore, the validity of statistical analyses from such data, which could be hampered by a slight delocalization of markers due to the type of tissue preparation, must be investigated.

PCA and HC from enzymatic digestion data To evaluate the digestion data, a rat brain tissue section (interaural, 7.20 mm, bregma, 1.80 mm) was subjected to trypsin digestion prior to matrix deposition (Fig. 5A and C). After PCA analysis, hierarchical clustering was applied to the data set. The results of the clustering are presented in Fig. 5B, and the dendrogram is shown in Fig. 5D. The image reconstructed from the clustering demonstrated a good correlation with the different brain areas determined in the brain section (Fig. 5A, C). The presented images had a low resolution due to one of the drawbacks of the software used (the number of data points accepted by the software). Therefore, HC imaging analysis data sets with a poor resolution (962 points at 250 μm) were recorded. This confirmed that a bottom-up strategy could be used for protein identification in tissues and was statistically relevant.

HC and N-terminal derivatization To simplify the protein identification procedure, derivatization strategies were

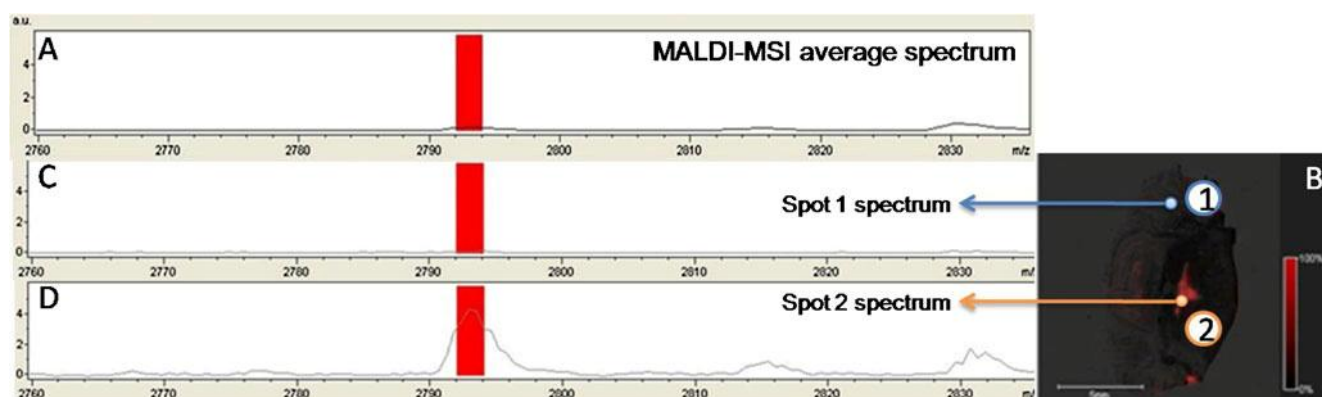
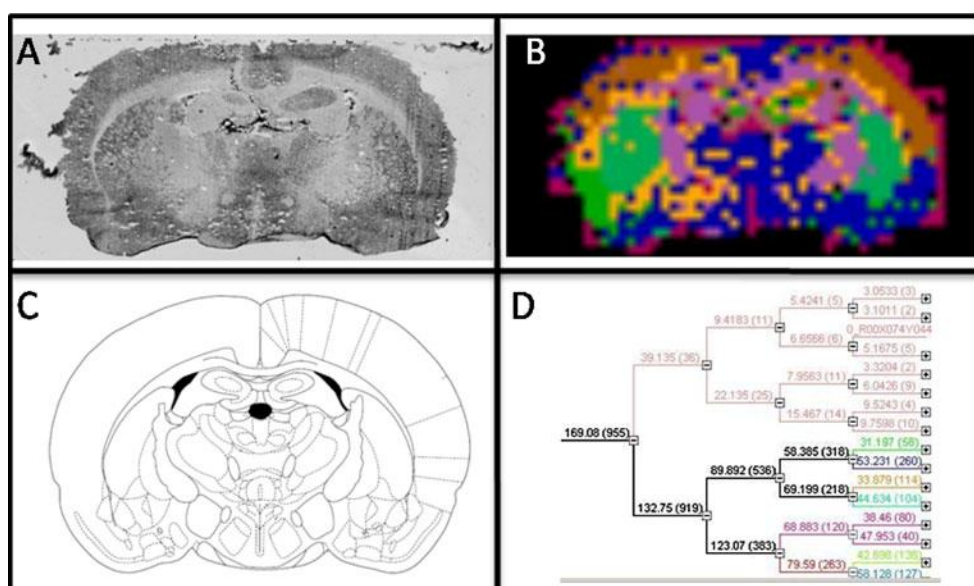


Fig. 4 A MALDI images of the average spectrum with a zoom in the m/z range of the ions at m/z 2,793, which are non-detectable. B Image of the m/z 2,793 ion distribution. C–D Single MALDI spectra recorded in the region where m/z 2793 is found (C) and not found (D)

Fig. 5 A Optical image and C image from the brain atlas of the rat brain tissue section used in the bottom-up experiment with on-tissue trypsin digestion. D HC dendrogram showing the differentiation of the different histological images and B HC image reconstructed from HC dendrogram data



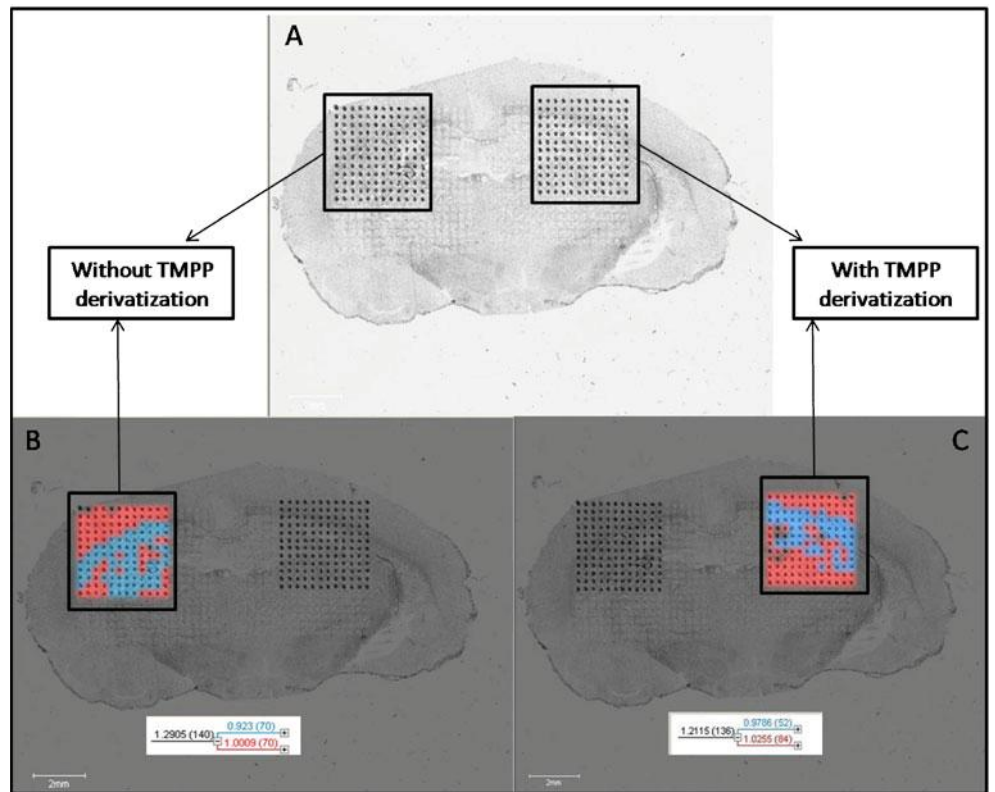
developed in the group to be performed on digestion peptides [32]. N-terminal chemical derivatization of peptides was developed in order to help in proteins identification by unambiguous determination of digestion peptides primary sequence. In fact addition of specific chemicals at the N-terminus of peptides, in peculiar positively or negatively charged groups, have shown to increase fragmentation ion yields and lead to orientation of fragmentation towards specific ion fragment series. This results in MS/MS spectra of much easier interpretation even for de novo sequencing, giving more confident identifications. Previously, several derivatization procedures were developed to be performed in situ at the tissue level [32] showing the interest of both derivatization by negative charge (derivatization with 4-SPITC (4-sulfophenyl isothiocyanate) or 3-SBASE (3-sulfobenzoic acid succinimidyl ester)) or positive charge (addition of TMPP (N-succinimidylloxycarbonylmethyl)-tris(2,4,6 trimethoxyphenyl)phosphonium bromide). Although if all derivatizations were usable at the global tissue level, only TMPP was found to be easily compatible with automatic micro deposition methods preventing delocalization of peptides during the derivatization process and subsequently allowing images to be recorded. Therefore, TMPP derivatization was chosen here to be used for multivariate analysis studies. In the present study, we tested PCA and HC on MALDI imaging data recorded from a rat brain tissue section (interaural, 4.84 mm, bregma, 4.16 mm) following micro-spotting trypsin digestion and then micro-spotting TMPP derivatization, as compared to micro-spotting of trypsin alone (Fig. 6). In this experiment, two distinct areas that were symmetrical according to the symmetry axis of the rat brain were

digested (Fig. 6B) and then derivatized (Fig. 6C). As demonstrated, the classification resulting from HC discriminated two regions, each of which was represented by a branch of the dendrogram. The first branch (red) corresponds to the cortex, whereas the second branch (blue) corresponds to the spectra depicting the corpus callosum. From the two dendrograms, it is clear that enzymatic digestion alone and enzymatic digestion followed by N-terminal chemical derivatization provide the same data classification. This result demonstrates that all types of data can be used for statistical analysis if the data is of sufficient quality, i.e., if the particular treatment used does not induce delocalization of the molecules.

In-source decay approach

The bottom-up approach is the most advanced and most widely used technique for protein identification and characterization because most instruments permit fragmentation of the amino acid sequence in the mass range of 500–3,500. Nevertheless, there are several fundamental and practical limitations to the bottom-up strategy. Most importantly, only a fraction of the total peptide population for a given protein is identified, and therefore, only a portion of the information for the protein sequence is provided. It is clear from genomic studies that each open-reading frame can give rise to many protein isoforms that originate from alternatively spliced products, and each isoform can present different types and locations of posttranslational modifications (PTMs). PTMs such as phosphorylation and glycosylation are known to be important in the regulation of protein function and cell

Fig. 6 A Optical image of a rat brain tissue section presenting two pitches that are symmetrically distributed and that correspond to a specific tissue preparation: enzymatic digestion (left) and enzymatic digestion followed by TMPP derivatization (right). HC was applied to the MALDI-MSI data for the two conditions, and the corresponding dendrogram and reconstructed images are presented B for trypsin digestion and C for trypsin digestion followed by TMPP derivatization



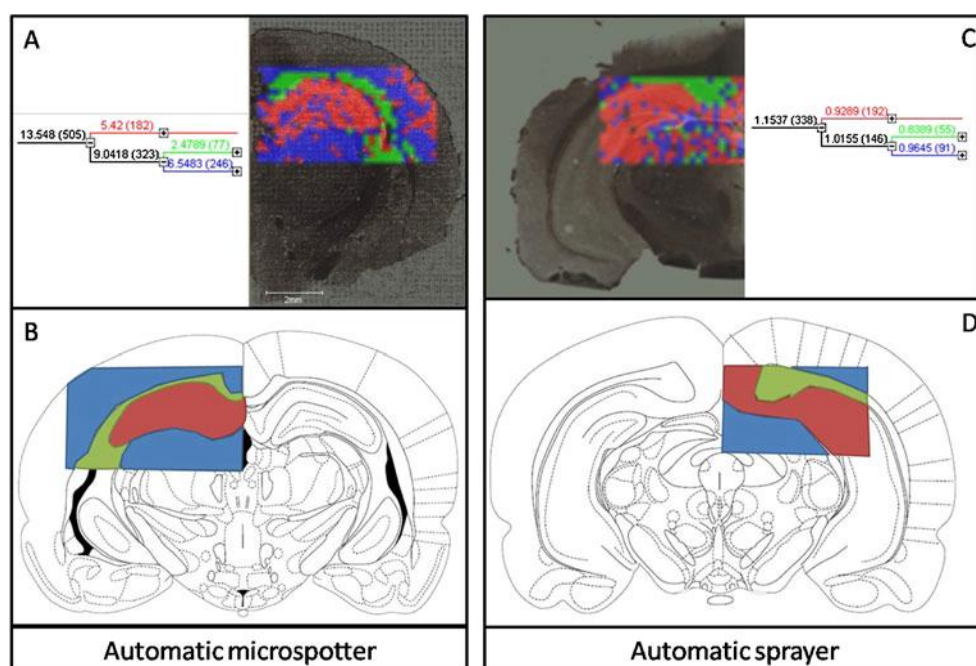
metabolism. A consequence of the limited sequence coverage in bottom-up proteomics is the global loss of information, including information concerning PTMs. In contrast, the top-down strategy provides potential access to a large part, and sometimes all, of the protein sequence, including its PTMs [39–45]. In addition, the time-consuming protein digestion step required for the bottom-up method is eliminated.

Classical top-down strategies are not possible using MALDI instruments because the instrumentation used for such purposes is not compatible with the very low charge states observed in MALDI. However, the top-down method without ion selection can be used with MALDI to rapidly generate fragmentation using ISD [39–46]. ISD has been demonstrated previously [33] for tissue sections. However, because ISD is not used with ion selection, the resulting mass spectra are extremely difficult to interpret. Here, we tested the ability of HC and PCA to facilitate interpretation of the ISD data. A previous publication has demonstrated the advantage of using a 1,5-DAN matrix for protein sequence and glycosylation characterization. The 1,5-DAN matrix is a good proton donor and tends to fragment proteins from their C-terminal region to produce c_i^+ and z_i^+ fragment ions [47]. In the present study, we developed a specific solid ionic matrix (1,5-DAN/camphor) to achieve better reproducibility, sensitivity and deposition facility by micro-spraying or micro-spotting of the matrix for ISD from tissues. We found that adding the camphor cyclic

terpenoid to the classical 1,5-DAN matrix resulted in average spectra with more intense peaks, which were found to be ISD ions. This process facilitated the detection of ions that corresponded to the tags used for protein identification in the images (Electronic Supplementary Material Fig. S1). This ionic matrix was also used for instrumentation preservation, and it demonstrated greater solubility in solvents that are classically used with automated micro-spraying and micro-spotting devices; 1,5-DAN alone was shown to be a matrix with a high level of deterioration for the deposition instruments.

PCH and HC for ISD-MALDI-MSI Clustering images (Fig. 7) were generated from the obtained MALDI images using 1,5-DAN/camphor, and subsequently, prompt fragments were obtained from whole proteins in the section at each position. Two different deposition methods for the matrix, the micro-spotter and the micro-sprayer, were used. The hierarchical clustering results are shown in Fig. 7A and C. The histological regions corresponding to the clusters are demonstrated symmetrically in Fig. 7B and D. We note that the classification of the spectra correlated with the histological areas of the tissue section. These clusters would not be detected if there were no differences between the spectra determined for each area. Therefore, it is possible to classify the specific ions by PCA and to reassemble them with greater ease to identify proteins of interest while suppressing common ions of the different

Fig. 7 HC analysis performed for MALDI-MSI data recorded in ISD from a rat brain tissue section using a 1,5-DAN/camphor ionic matrix deposited with an automatic micro-spotter (A) and with an automatic micro-sprayer (C). (B and D) Schematic representation of the spectral classification for each cluster. Green: cingulum, red: dentate gyrus, blue: combination of cerebral cortex and hippocampus



class (common proteins). Unfortunately, we identified only myelin in the cingulum region of the rat brain section (Electronic Supplementary Material Fig. S1) using this technology. Moreover, it was often difficult to analyze properly one of the amino acid sequences within a spectrum ISD due to the large number of peaks that were detected for the different proteins. Thus, using HC, we were able to identify differences between histological regions and PCA, which permitted the efficient detection of differences in the complexity of the ISD spectra. Importantly, ISD can be only performed using frozen tissue (never formalin-fixed paraffin-embedded tissues), and only major proteins with a high abundance can be detected. The developments of on-tissue depletion methods are clearly necessary to further the uses of such techniques.

PCA and HC in the bottom-up approach: application to FFPE prostate cancer tissues

The opportunity to investigate archived FFPE tissues will pave the way toward a gold mine of tissue samples that are stored in pathological institutes for retrospective studies. Consequently, many efforts by others and by our group [35, 37] have been implemented to find a strategy to analyze tissues using MALDI-MSI [37, 48–50]. Most of the libraries are builds of FFPE tissues because this preservation protocol produces well-conserved morphology and high stability along time avoiding degradation of molecules. However, the major difficulty associated with such tissue is the occurrence of protein cross-linking due to tissue fixation. Indeed, formalin creates methylene bonds

between proteins and prevents direct tissue analysis by MALDI-MSI. To circumvent this problem, enzymatic digestion using, for example, trypsin is used to obtain and to identify protein fragments, and therefore, a bottom-up approach is used [35]. Because cross-linking is still pursuing in FFPE tissue blocks during conservation period, protein accessibility becomes more difficult over time, and enzyme cleavage can be affected leading to poor enzymatic yields. Therefore, it is necessary to establish processes that facilitate access to proteins. Similar challenges are encountered for HIC of FFPE samples. Over time, many different protocols have been developed to unmask antigen epitopes [24, 51–60]. These so-called AR processes are still not well understood in terms of the associated molecular changes. The most reasonable hypothesis is that AR allows changes in the conformation of cross-linked proteins and thus facilitates access to sites within the proteins. To date, many different AR protocols have been published [24, 51–60]. However, according to the nature of the tissue used and the protein (antigen) under consideration, some protocols work better than others which are not yet well understood. Consequently, systematic tests of different AR protocols are required to define the best protocol. Here, we have tested several AR processes on prostate cancer FFPE tissues including EDTA pH 8 hot baths or in a pressure cooker, heat-induced AR using microwave and citric acid pH 6 or CAAR in a hot bath. CAAR was found to provide better results for prostate cancer tissue sections with respect to trypsin digestion approach. We have performed a bottom-up analysis of FFPE tissue from grade IV prostate cancer samples using trypsin as the enzyme and HCCA/ANI as the matrix, with a micro-spraying device. In a grade IV

carcinoma section, several histological cell types were observed that resembled tumor or stroma with normal acini (close to normal) regions, as classified by the pathologist. Thus, the spectra of these two specific regions were collected before they were exported for the HC and PCA analyses (Fig. 8A). The dendrogram from the hierarchical clustering divides the spectra into two branches. The locations of these branches are shown in Fig. 8B. Classification of the spectra correlated with their histological origin (cancer grade IV in red vs. stroma with acini in green; Fig. 8B). This ranking suggests that it is possible to use the MS profiles (in this context, peptides and proteins) as a “signature” for cell phenotype classification or MSI histology, and it may allow the development of a new diagnostic approach based on the molecular signature and not on a specific biomarker alone. To illustrate this idea, two ROIs (ROI1 and ROI2) that were determined in different regions of the tissue were added to the analysis (Fig. 8C) together with the previous regions. HC analysis

was performed for these four regions. The resulting HC dendrogram revealed an initial separation into two branches and then a sub-division of each of these branches into two others. The first two branches (first division) were represented as an image on the tissue (Fig. 8D). In Fig. 8D, grade IV tumor and stroma with acini clusters can still be observed as distinct areas, with each area corresponding to a branch. However, it should be noted that the ROI1 spectra appear close to the stroma and tumor profiles, whereas ROI2 has a profile that is closer to the tumor alone. However, based on the sub-branch dendrogram analysis (Fig. 8E), we note that the turquoise blue cluster of ROI2 differs from the red cluster of the tumor and correspond to a sub-division. In contrast, ROI1 consistently shows a signature that is closer to the tumor and the stroma with acini. Therefore, it is possible to use the same approach for different biopsies and to correlate the signatures of the clusters obtained for the examined histological areas using a bank of peptide/protein signatures

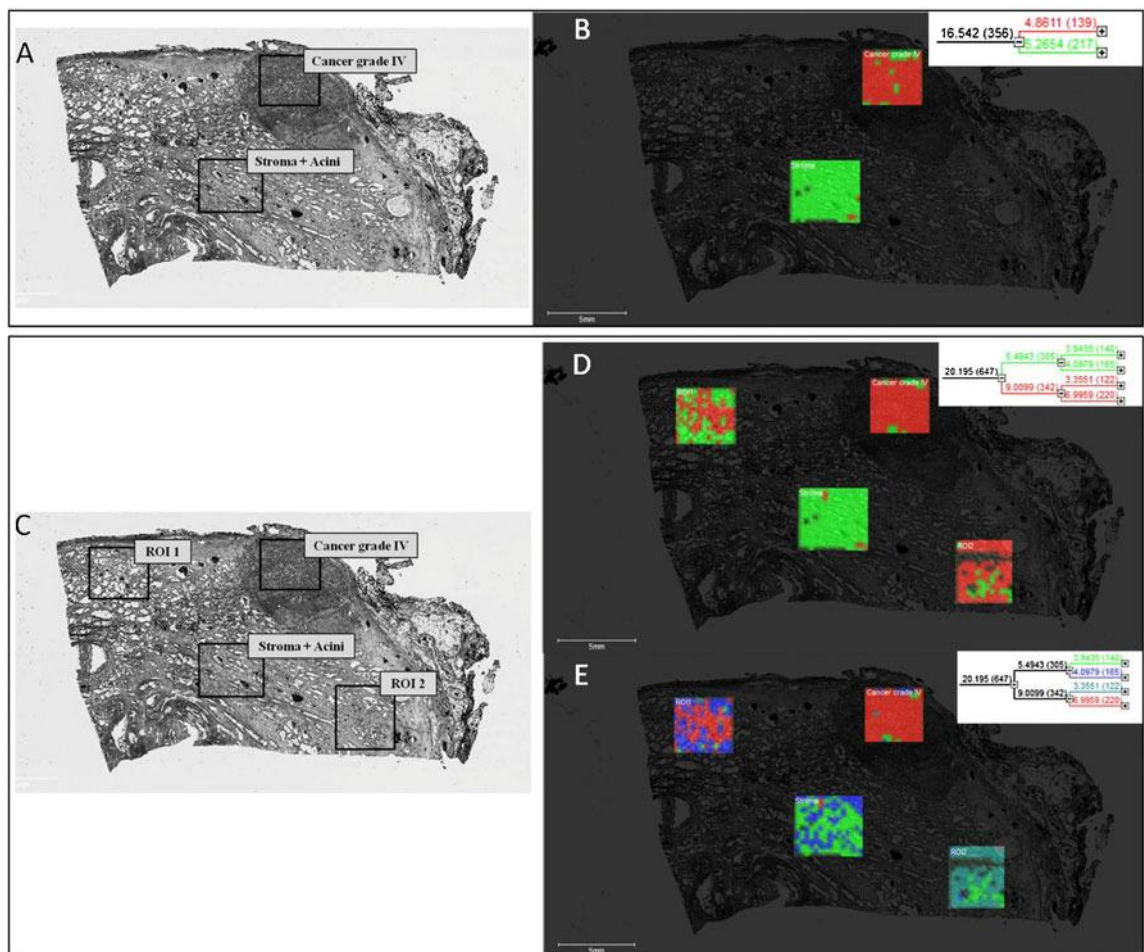


Fig. 8 HC analysis of FFPE prostate cancer tissue after on-tissue trypsin digestion. A Delimitation of stroma with acini and cancer grade IV regions on the optical image of the tissue. B HC results (dendrogram and image) for the cancer and stroma with acini spectra.

C Delimitation of the new ROIs on the optical image of the tissue. D–E HC results (dendrogram and image) for four regions (stroma + acini, cancer, ROI1 and ROI2)

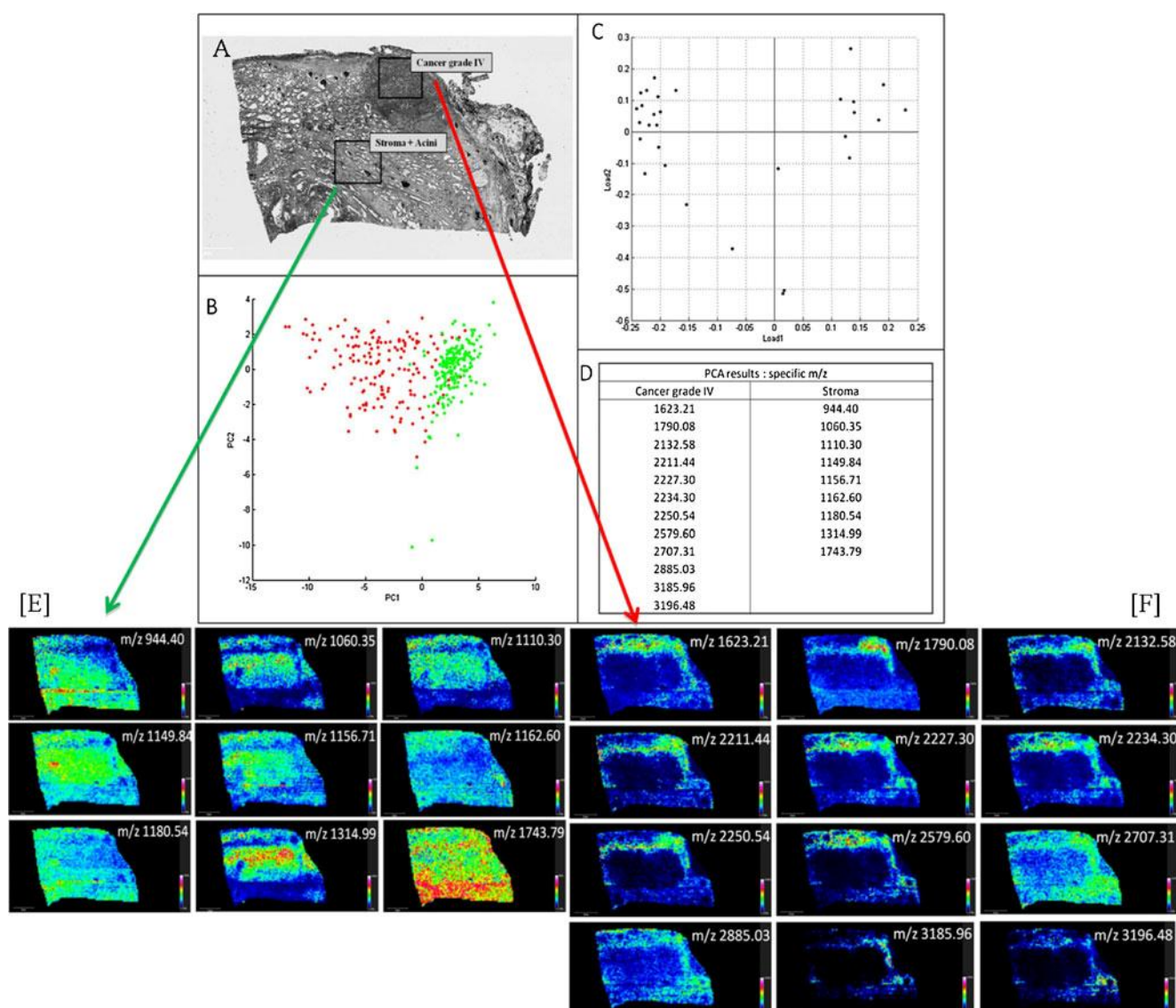


Fig. 9 Supervised PCA analysis of prostate cancer grade IV FFPE tissue after on-tissue trypsin digestion. A Optical images indicating the stroma with acini and cancer grade IV regions. B Score plot (green: stroma with acini spectra, red: cancer grade IV spectra). C Loading

plot. D List of m/z specific for each region. E–F MALDI-MSI images of the ions determined by PCA in the stroma with acini (E) and in the tumor region (F)

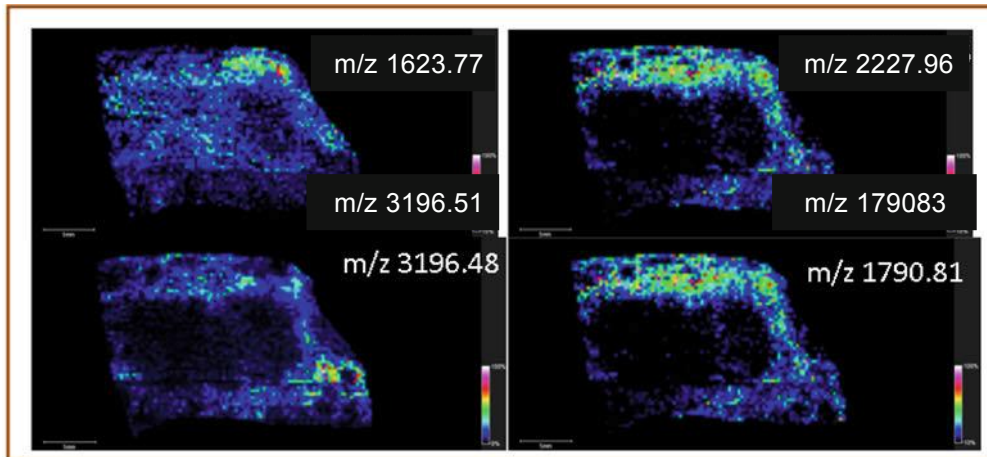
generated from tissues for which the pathologic stages are known.

The spectral classification for the grade IV tumor and stroma with acini area also supports the conclusion that specific m/z are related to the histologic classification. The PCA-SDA strategy can be performed to track markers for each cell phenotype (Fig. 9A). The score plot (Fig. 9B) and loading plot (Fig. 9C) obtained after supervised PCA analysis provides a list of m/z that are specific to each area (Fig. 9D), determining clusters. Images of the ions detected in the stroma with acini are presented in Fig. 9E, and those detected in the tumor region are shown in Fig. 9F. To further understand the progression of cancer, it is of primary importance to identify the ions detected for each cell

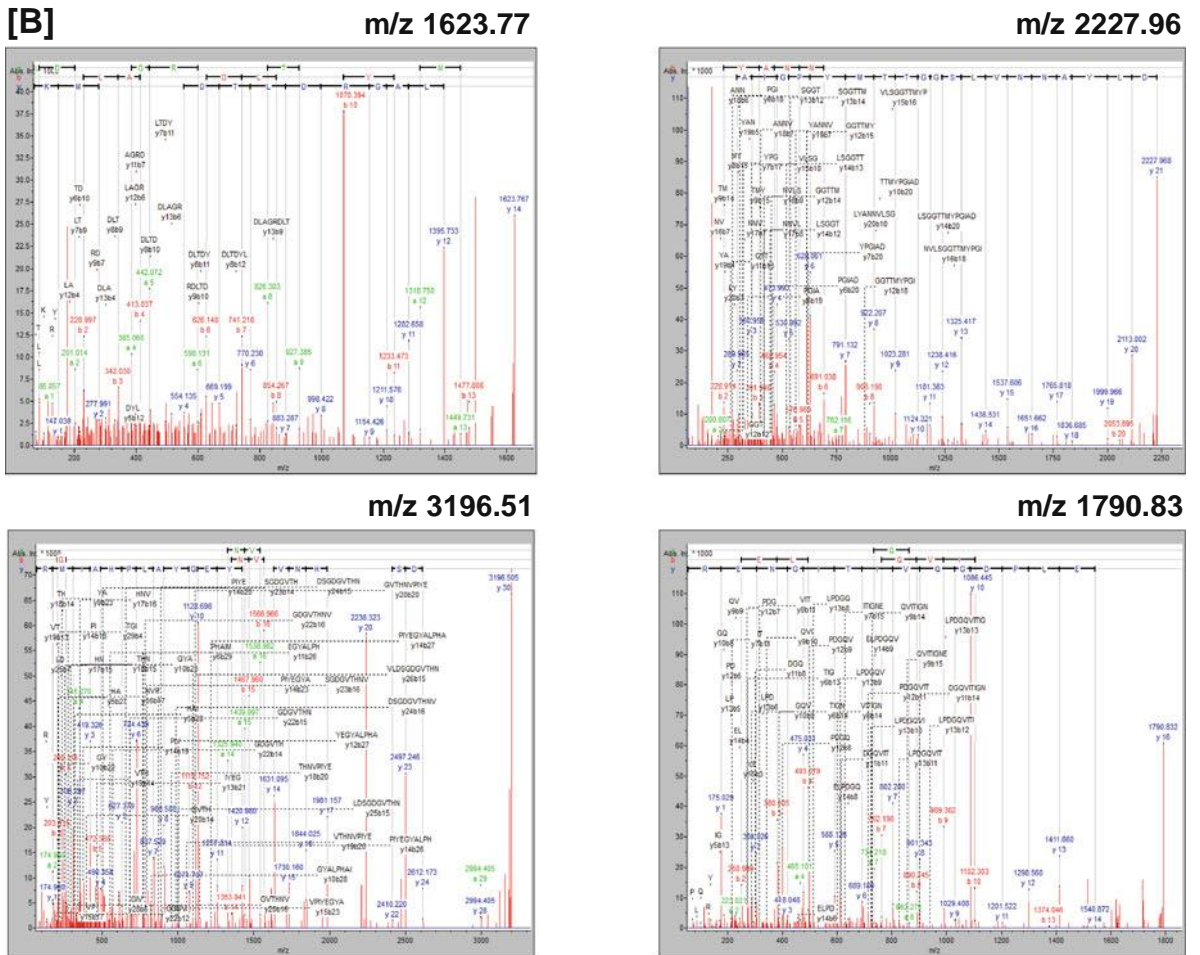
phenotype, i.e., tumor vs. stroma + acini. As described previously, enzymatic digestion does not lead to delocalization and allows a hierarchical classification. The PCA analysis related to the tissue type to be performed to highlight the presence of specific markers in the different cell types. Therefore, the bottom-up approach could be

Fig. 10 A MALDI-MSI molecular images of several fragments of α -actin tryptic fragments detected by PCA-SDA from the tissue section after AR and trypsin digestion, B MS/MS spectra of these actin tryptic fragments and C sequence coverage if these four fragments on the actin protein sequence. These images and MS/MS data were generated from the adjacent tissue section of the same patient biopsy used in the experiments corresponding to images presented Fig. 9

[A]



[B]



[C]

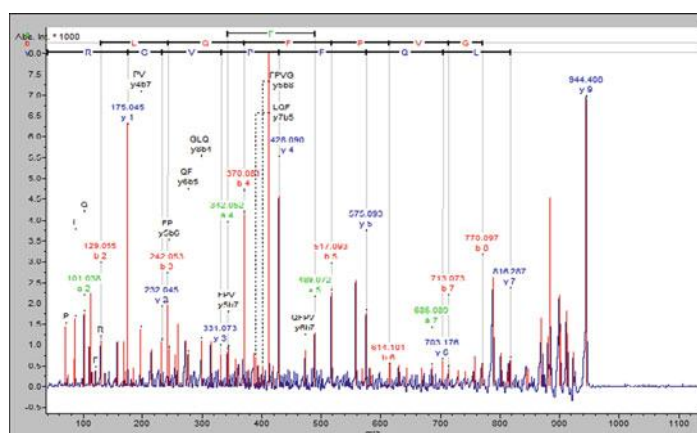
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
MCEEETALV	CDNSSLCKA	GFAGDDAPRA	VFPSIVGRPR	HQGMVGMGQ	KDSYVGDEAQ	SKRGLILTKY	PIEHGIITNW	DMEKIWHHS	FYNELRVAPE	EHPTLLTEAP
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
LNPKANREKM	TQIMFETFNW	PAMYVAIQAV	LSIYASGRIT	GIVLDSGDGV	THNWPIYEGY	ALPHAIMRLD	LAGRLDIDYL	MKILTERGYS	FVTTAEREIV	RDIKELICVY
230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
ALDFENEMAT	AASSSLEKS	YELPDGVII	IGNERFCPE	TLFQPSFIGM	ESAGIHETTY	NSIMKCDIDI	RKDLIANNVL	SGGTIMYPGI	ADRMQKEITA	LAPSTMKIKI
340	350	360	370	380						
IAPPERKYSV	WIGGSILASL	SIFQQMWISK	FEYDEAGPSI	VHRKCF						

useful for analyses of FFPE tissues from pathologist libraries. Some ions obtained using PCA-SDA were directly identified in the tissue section after the CAAR antigen retrieval procedure by MS² using the MALDI-TOF/TOF instrument. A second experiment was performed from the adjacent tissue section of the FFPE biopsy block. Same MS profiles were again observed with an identical correlation of ions distribution with respect to the morphology of the tissue according to cell phenotypes. From this tissue MS² experiments were undertaken for identification of proteins. MS² was performed for precursor ions at m/z 944.4, 1,180.54, 1,623.21, 1,743.79, 1,790.08, 2,227.30, and

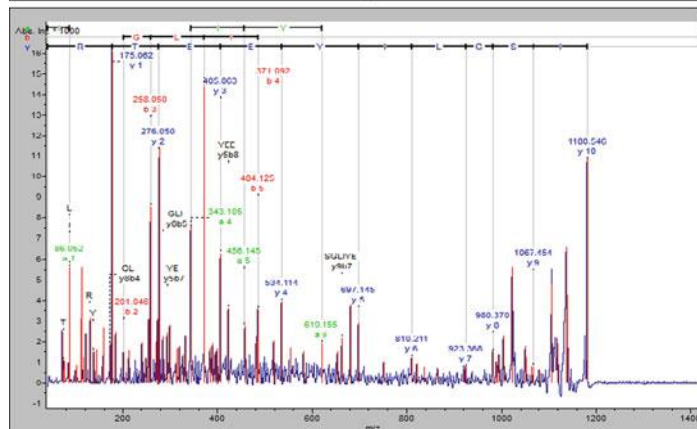
3,196.48 (Figs. 10 and 11). These ions correspond to actin fragments (Fig. 10B) or to histone H4, histone 2A type 1-A, and histone 2B type 1-B (Fig. 11). Interestingly, all of the actin fragments were specifically localized in the tumor region and not in the stroma with normal acini, which is consistent with the PCA-SDA results (Fig. 10A), whereas the histone fragments were localized in the stroma with acini (Fig. 8E). The ions related to actin present in the tumor region presented sequence coverage of 21.5% and were localized to the C-terminal portion of the protein, which suggested that the N-terminal portion of the protein was less accessible due to the presence of methylene bonds or to

Fig. 11 MS/MS spectra recorded from prostate cancer FFPE tissue sections after AR and trypsin digestion of three different ions (three histones) found by PCA-SDA to be specifics of the stroma with acini region

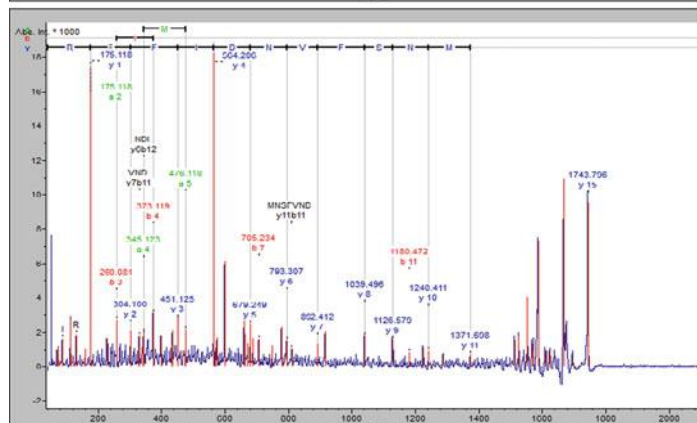
[A]
Histone H2A type 1-A
m/z 944.40
AGLQFPVGR



[B]
Histone H4
m/z 1180.54
ISGLIYEETR



[C]
Histone H2B type 1-B
m/z 1743.79
AMGIMNSFVNDIFER



protein truncation (Fig. 10C). All the identified proteins, related tryptic peptide sequences, identification scores and Mw are summarized in Table 2. Ions attributing to the different MS/MS spectra corresponding to the different tryptic fragments studied are summarized in Electronic Supplementary Material Table S1. These experiments were reiterated on another FFPE block from a different patient performing experiments in triplicate from adjacent tissue slices. Similar results were obtained from this second patient. Identical ions were observed from this biopsy and ions distribution were again correlated to the same cells according to their morphological type (cell phenotype) The presence of actin in the tumor region is consistent with the cytoskeletal remodeling that occurs during prostate cancer development together with muscle contraction. The detection of histone types in the stroma with acini seems to indicate mitotic and apoptotic indices for these cells, which reflects the possibility that their phenotype is more similar to benign than to healthy cells. These data are consistent with the results obtained for other cancers, such as breast [50] or ovarian [18] cancers. Interestingly, we showed that based on the 150 m/z detection using PCA-SDA in the tumor region, only four were related to actin. This result supports the finding that not only major proteins can be detected using the bottom-up strategy. These findings highlight the necessity to develop new approaches to gain access to the minor m/z detected using PCA-SDA. In fact, AR followed by enzymatic digestion is not sufficient for the identification of these markers or for other minor ones. Nevertheless, several MS/MS studies have been performed, and identification problems have been encountered due to the methylene bridges that occur between proteins. In fact, in some cases, MS/MS spectra were uninterpretable and did not provide any identification results. This phenomenon was presumably attributed to the presence of cross-linked peptides that were linked by a methylene bridge. Thus, fundamental investigations are necessary to fully understand the chemistry of fixation and the formation of methylene bridges to develop the appropriate software for MS/MS spectral analysis from FFPE tissues.

Conclusion

The PCA-SDA based on hierarchical clustering represents an excellent, fast, and reproducible technique for the analysis of MSI data to search for markers. We showed that this approach is useful after different tissue treatments, such as enzyme digestion and N-terminal derivatization, which are used in bottom-up strategies for the direct identification of ions of interest in the tissue. Thus, it is possible to combine the MALDI-MSI and bottom-up approach for protein identification. This can be conducted

Table 2 Identified proteins by on-tissue MS/MS after enzymatic digestion of a FFPE section of prostate cancer

Measured m/z	Mw (experimental)	Mw (calculated)	Delta	z	Miss cleavage	Mascot score	Expect	Peptide sequence	Protein name
944.40	943.39	943.52	-0.13	+1	0	49	0.00075	AGLQFPVGR	H2A1A_HUMAN
1,180.54	1,179.53	1,179.61	-0.08	+1	0	54	0.0002	ISGLIYEETR	H4_HUMAN
1,623.76	1,622.76	1,622.83	-0.08	+1	1	43	0.0019	LDLAGRDLTDYLMK	ACTA_HUMAN
1,743.79	1,742.78	1,742.81	-0.03	+1	0	88	5.8e-08	AMGIMNSFVNDIFER	H2B1B_HUMAN
1,790.81	1,789.80	1,789.88	-0.08	+1	0	91	2.5e-08	SYELPDGQVITIGNER	ACTA_HUMAN
2,227.97	2,226.96	2,227.06	-0.10	+1	0	127	5.8e-12	DLYANNVLSGGTMYPGIADR	ACTA_HUMAN
3,196.48	3,195.48	3,195.60	-0.12	+1	0	132	1.1e-12	TTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMR	ACTA_HUMAN

via enzymatic digestion, derivatization, and PCA-SDA based on hierarchical clustering for protein fragment detection and identification. All of these steps can be performed for the same tissue and in only one experiment. Data obtained using the top-down method with ISD can also be used for PCA-SDA following on-tissue depletion to highlight proteins other than the major ones. In the near future, the most promising development will be the emergence of databases that are based on approaches using these statistical models. The creation of mathematical models that represent histological groups could enable a significant advance for molecularly based diagnostic and prognostic studies.

Acknowledgments This research was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Éducation Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to IF), Institut du Cancer (INCA to IF), Région Nord-Pas de Calais (PhD financing to DB and RL), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR to RD) and the Ministère du Développement Économique, de l'Innovation et de l'Exportation (MDEIE to RD) du Québec and the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ to RD). RD is a member of the Centre de Recherche Clinique Étienne-Le Bel (Sherbrooke, QC, Canada).

References

- Caprioli RM, Farmer TB, Gile J (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOFMS. *Anal Chem* 69(23):4751–4760
- McLean JA, Ridenour WB, Caprioli RM (2007) Profiling and imaging of tissues by imaging ion mobility-mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 42(8):1099–1105
- Sugiura Y, Shimma S, Konishi Y, Yamada MK, Setou M (2008) Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS ONE* 3(9):e3232
- Landgraf RR, Prieto Conaway MC, Garrett TJ, Stacpoole PW, Yost RA (2009) Imaging of lipids in spinal cord using intermediate pressure matrix-assisted laser desorption-linear ion trap/Orbitrap MS. *Anal Chem* 81(20):8488–8495
- Taban IM, Altelaar AF, van der Burgt YE, McDonnell LA, Heeren RM, Fuchser J, Baykut G (2007) Imaging of peptides in the rat brain using MALDI-FTICR mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 18(1):145–151
- Sugiura Y, Setou M (2009) Imaging mass spectrometry for visualization of drug and endogenous metabolite distribution: toward in situ pharmacometabolomes. *J Neuroimmune Pharmacol*
- Khatib-Shahidi S, Andersson M, Herman JL, Gillespie TA, Caprioli RM (2006) Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 78(18):6448–6456
- Prideaux B, Staab D, Stoeckli M (2010) Applications of MALDI-MSI to pharmaceutical research. *Methods Mol Biol* 656:405–413
- Stoeckli MSD, Schweitzer A (2007) Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections. *Int J Mass Spectrom* 260:195–202
- Franck J, Arafah K, Barnes A, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I (2009) Improving tissue preparation for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. Part 1: using microspotting. *Anal Chem* 81(19):8193–8202
- Lemaire R, Wisztorski M, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I (2006) MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem* 78(20):7145–7153
- Seeley EH, Caprioli RM (2008) Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(47):18126–18131
- Jardin-Mathe O, Bonnel D, Franck J, Wisztorski M, Macagno E, Fournier I, Salzet M (2008) MITICS (MALDI imaging team imaging computing system): a new open source mass spectrometry imaging software. *J Proteomics*
- Stoeckli M, Farmer TB, Caprioli RM (1999) Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument. *J Am Soc Mass Spectrom* 10(1):67–71
- Chaurand P, Schriver KE, Caprioli RM (2007) Instrument design and characterization for high resolution MALDI-MS imaging of tissue sections. *J Mass Spectrom* 42(4):476–489
- Koestler M, Kirsch D, Hester A, Leisner A, Guenther S, Spengler B (2008) A high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization ion source for imaging analysis on an ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(20):3275–3285
- Caprioli RM (2008) Perspectives on imaging mass spectrometry in biology and medicine. *Proteomics* 8(18):3679–3680
- El Ayed M, Bonnel D, Longuespee R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M (2010) MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Med Sci Monit* 16(8):BR233–45
- Franck J, Arafah K, Elayed M, Bonnel D, Vergara D, Jacquet A, Vinatier D, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M (2009) MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 8(9):2023–2033
- McDonnell LA, Corthals GL, Willems SM, van Remoortere A, van Zeijl RJ, Deelder AM Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research. *J Proteomics* 73(10):1921–1944
- Wisztorski M, Croix D, Macagno E, Fournier I, Salzet M (2008) Molecular MALDI imaging: an emerging technology for neuroscience studies. *Dev Neurobiol* 68(6):845–858
- Wisztorski M, Lemaire R, Stauber J, Menguélet SA, Croix D, Mathe OJ, Day R, Salzet M, Fournier I (2007) New developments in MALDI imaging for pathology proteomic studies. *Curr Pharm Des* 13(32):3317–3324
- Bakry R, Rainer M, Huck CW, Bonn GK (2011) Protein profiling for cancer biomarker discovery using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and infrared imaging: a review. *Anal Chim Acta* 690(1):26–34
- Gustafsson JO, Oehler MK, McColl SR, Hoffmann P (2010) Citric acid antigen retrieval (CAAR) for tryptic peptide imaging directly on archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Proteome Res* 9(9):4315–4328
- Drake RR, Cazares LH, Jones EE, Fuller TW, Semmes OJ, Laronga C (2011) Challenges to developing proteomic-based breast cancer diagnostics. *OMICS* (in press)
- Seeley EH, Caprioli RM (2011) MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives. *Trends Biotechnol* 29(3):136–143
- Van de Plas R, Ojeda F, Dewil M, Van Den Bosch L, De Moor B, Waelkens E (2007) Prospective exploration of biochemical tissue composition via imaging mass spectrometry guided by principal component analysis. *Pac Symp Biocomput* 2007:458–469

28. Deininger SO, Ebert MP, Futterer A, Gerhard M, Rocken C (2008) MALDI imaging combined with hierarchical clustering as a new tool for the interpretation of complex human cancers. *J Proteome Res*
29. Walch A, Rauser S, Deininger SO, Hofler H (2008) MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol* 130(3):421–434
30. Trim PJ, Atkinson SJ, Princivalle AP, Marshall PS, West A, Clench MR (2008) Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging of lipids in rat brain tissue with integrated unsupervised and supervised multivariate statistical analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(10):1503–1509
31. Franck J, Ayed ME, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I (2010) On tissue protein identification improvement by N-terminal peptide derivatization. *Methods Mol Biol* 656:323–338
32. Franck J, El Ayed M, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I (2009) On-tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies. *Anal Chem* 81(20):8305–8317
33. Debois D, Bertrand V, Quinton L, De Pauw-Gillet MC, De Pauw E (2010) MALDI-in source decay applied to mass spectrometry imaging: a new tool for protein identification. *Anal Chem* 82(10):4036–4045
34. Seeley EH, Oppenheimer SR, Mi D, Chaurand P, Caprioli RM (2008) Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J Am Soc Mass Spectrom* 19(8):1069–1077
35. Lemaire R, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I (2007) Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Proteome Res* 6(4):1295–1305
36. Groseclose MR, Andersson M, Hardesty WM, Caprioli RM (2007) Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 42(2):254–262
37. Stauber J, Lemaire R, Franck J, Bonnel D, Croix D, Day R, Wisztorski M, Fournier I, Salzet M (2008) MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. *J Proteome Res* 7(3):969–978
38. Wisztorski M, Franck J, Salzet M, Fournier I (2010) MALDI direct analysis and imaging of frozen versus FFPE tissues: what strategy for which sample? *Methods Mol Biol* 656:303–322
39. Reiber DC, Grover TA, Brown RS (1998) Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source fragmentation data combined with database searching. *Anal Chem* 70(4):673–683
40. Reiber DC, Brown RS, Weinberger S, Kenny J, Bailey J (1998) Unknown peptide sequencing using matrix-assisted laser desorption/ionization and in-source decay. *Anal Chem* 70(6):1214–1222
41. Brown RS, Lennon JJ (1995) Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein/peptide ions. *Anal Chem* 67(21):3990–3999
42. Hardouin J (2007) Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 26(5):672–682
43. Takayama M, Tsugita A (2000) Sequence information of peptides and proteins with in-source decay in matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21(9):1670–1677
44. Takayama M (2001) In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 12(4):420–427
45. Suckau D, Resemann A (2003) T3-sequencing: targeted characterization of the N- and C-termini of undigested proteins by mass spectrometry. *Anal Chem* 75(21):5817–5824
46. Resemann A, Wunderlich D, Rothbauer U, Warscheid B, Leonhardt H, Fuchser J, Kuhlmann K, Suckau D Top-down de Novo protein sequencing of a 13.6 kDa camelid single heavy chain antibody by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 82(8):3283–3292
47. Demeure K, Quinton L, Gabelica V, De Pauw E (2007) Rational selection of the optimum MALDI matrix for top-down proteomics by in-source decay. *Anal Chem* 79(22):8678–8685
48. Groseclose MR, Massion PP, Chaurand P, Caprioli RM (2008) High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. *Proteomics* 8(18):3715–3724
49. Ronci M, Bonanno E, Colantoni A, Pieroni L, Di Ilio C, Spagnoli LG, Federici G, Urbani A (2008) Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to MALDI-TOF imaging MS investigations. *Proteomics* 8(18):3702–3714
50. Djidja MC, Francese S, Loadman PM, Sutton CW, Scriven P, Claude E, Snel MF, Franck J, Salzet M, Clench MR (2009) Detergent addition to tryptic digests and ion mobility separation prior to MS/MS improves peptide yield and protein identification for in situ proteomic investigation of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinoma tissue sections. *Proteomics* 9(10):2750–2763
51. Tian Y, Zhang H (2010) Isolation of proteins by heat-induced extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and preparation of tryptic peptides for mass spectrometric analysis. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 10, Unit 10 26 1–7
52. Xu H, Yang L, Wang W, Shi SR, Liu C, Liu Y, Fang X, Taylor CR, Lee CS, Balgley BM (2008) Antigen retrieval for proteomic characterization of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Proteome Res* 7(3):1098–1108
53. Shi SR, Liu C, Perez J, Taylor CR (2005) Protein-embedding technique: a potential approach to standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem* 53(9):1167–1170
54. D'Amico F, Skarmoutsou E, Stivala F (2009) State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J Immunol Methods* 341(1–2):1–18
55. Yamashita S (2007) Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 41(3):141–200
56. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (2001) Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* 49(8):931–937
57. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (2001) Antigen retrieval immunohistochemistry and molecular morphology in the year 2001. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9(2):107–116
58. Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ, Taylor CR (2004) DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol* 122(3):211–218
59. Shi SR, Shi Y, Taylor CR (2007) Updates on antigen retrieval techniques for immunohistochemistry. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 36(1):7–10
60. Shi SR, Liu C, Young L, Taylor C (2007) Development of an optimal antigen retrieval protocol for immunohistochemistry of retinoblastoma protein (pRB) in formalin fixed, paraffin sections based on comparison of different methods. *Biotech Histochem* 82(6):301–9

Article 5

The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling

Rémi Longuespée · Charlotte Boyon · Céline Castellier · Amélie Jacquet · Annie Desmons · Olivier Kerdraon · Denis Vinatier · Isabelle Fournier · Robert Day · Michel Salzet

Accepted: 30 March 2012
Springer-Verlag 2012

Abstract This study reports on the C-terminal fragment of the 11S proteasome activator complex (PA28 or Reg alpha), a novel ovarian-specific biomarker of early and late stages of ovarian cancer (OVC) relapse, in patient biopsies after chemotherapy. A total of 179 tissue samples were analyzed: 8 stage I, 55 stage III–IV, 10 relapsed serous carcinomas, 25 mucinous carcinomas and 12 borderline and 68 benign ovarian tissue samples. This fragment was detected by MALDI mass spectrometry profiling in conjunction with a novel extraction method using hexafluoroisopropanol (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; HFIP) solvents for protein solubilization and by immunohistochemistry using a specific antibody directed against the C-terminal fragment of PA28. Due to its specific cellular localization, this fragment is a suitable candidate for early OVC diagnosis, patient prognosis and follow-up during therapy and discriminating borderline cancers. Statistical analyses performed for this marker at different OVC stages

reflect a prevalence of 77.66 ± 8.77 % (with a correlation coefficient value $p < 0.001$ of 0.601 between OVC and benign tissue). This marker presents a prevalence of 88 % in the case of tumor relapse and is detected at 80.5 % in stage I and 81.25 ± 1.06 % in stage III–IV of OVC. The correlation value for the different OVC stages is $p < 0.001$ of 0.998. Taken together, this report constitutes the first evidence of a novel OVC-specific marker.

Keywords Ovarian cancer MALDI imaging Biomarker Relapse Diagnostic Mass spectrometry

Introduction

Since the concept of directly identifying molecules on tissues using MALDI ion sources was proposed at the end of the 1990s (Caprioli et al. 1997), MALDI imaging mass spectrometry has been used in many clinical applications (Cornett et al. 2006; El Ayed et al. 2010; Lemaire et al. 2006a, b; Pevsner et al. 2009; Schwamborn et al. 2007; Schwartz et al. 2004; Seeley and Caprioli 2008). A decade of developments in instrumentation and chemistry has been required to achieve optimal extraction, detection, and spatial resolution when mapping compounds at the tissue level (Franck et al. 2009a, b; Lemaire et al. 2006a, b; 2007a; van Remoortere et al. 2010). These developments, combined with using the appropriate data-processing tools, gave rise to the discovery of biomarkers for diverse pathologies (Bonnell et al. 2011; Djidja et al. 2010; McCombie et al. 2005; Stauber et al. 2008), of which cancer is the most studied. MALDI mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) technology makes it possible to study the molecular profiles of the benign and malignant portions of a solid tumor. This technique is particularly

R. Longuespée · C. Boyon · C. Castellier · A. Jacquet · A. Desmons · D. Vinatier · I. Fournier · M. Salzet (&)
Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique
Fondamentale et Appliquée, Université Nord de France,
EA 4550, Université de Lille 1, Cité Scientifique,
59650 Villeneuve D'Ascq, France
e-mail: Michel.salzet@univ-lille1.fr

R. Longuespée · R. Day
Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Université de
Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

C. Boyon · C. Castellier · A. Jacquet · D. Vinatier
Hôpital Jeanne de Flandre, Service de Chirurgie Gynécologique,
CHRU Lille, 59037 Lille Cedex, France

O. Kerdraon
Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques,
CHU Lille, 59037 Lille Cedex, France

interesting for screening biomarkers in stage I cancer biopsies, a stage when the disease is still treatable and the 5-year survival rate for managed patients is yet high.

In the USA, ovarian cancer (OVC) is the sixth most prevalent cancer among women and the second most prevalent gynecologic cancer (after endometrial cancer). A total of 21,550 new cases and 14,600 deaths were reported in 2009 (Khalil et al. 2010). Cancer antigen 125 (CA-125; MUC16) is the most commonly used of the known biomarkers. CA-125 has a sensitivity of 80 % and a specificity of 97 % in epithelial cancers (stage III or IV). However, its sensitivity is approximately 30 % in stage I cancers because it is associated with several physiological phenomena and is also detectable in benign circumstances (Lambaudie et al. 2006). Therefore, CA-125 is useful for monitoring disease progression, but it cannot be used as a biomarker to screen for early-stage disease in large cohorts (Lambaudie et al. 2006).

Our group has previously found that the C-terminal fragment of the 11S proteasome activator (PA28, Reg alpha) was specifically found in cancerous ovarian biopsies and not in benign tissues (Lemaire et al. 2005; 2007b) (Table 1). Using 25 ovarian carcinomas (stage III and IV) and 23 benign ovarian tissues analyzed by MALDI-TOF-MS, this new biomarker was detected with a high prevalence (80 %) and has been fully characterized using MALDI-MS and nano-ESI trypsin peptides profiling. The full identification was performed by nano-ESI-QTOF in MS/MS mode. This marker has an m/z ratio of 9,744 and corresponds to 84 amino acid residues from the 11S proteasome activator complex

named PA28 or Reg alpha. This marker was validated using MALDI imaging, by classical immunocytochemistry with an antibody against the C-terminal portion of the protein, by specific MALDI with an anti-Reg alpha-tagged antibody and by Western blot analyses. The results confirmed the epithelial localization of this fragment, with a nuclear localization in benign epithelial cells and a cytoplasmic localization in malignant cells (Lemaire et al. 2005, 2007b; Stauber et al. 2006). More recently, 20 ovarian carcinomas (stages I, III and IV) and 10 borderline and 20 benign ovarian tissue samples were directly analyzed by automatic profiling mass spectrometry subjected to hierarchical clustering, using unsupervised principal component analysis and characterized using a tissue bottom-up strategy after on-tissue digestion and shotgun sequencing by nano-LC-IT-MS in MS/MS mode (El Ayed et al. 2010; Franck et al. 2010). In all of the cases, the C-terminal fragment of Reg alpha was detected and identified. We also confirmed that this peptide is a marker for the immunosuppressive events that occur during disease progression (Franck et al. 2009a; Longuespée et al. 2012).

Based on previous data showing that the Reg-alpha C-terminal fragment can be detected in the late stages (III–IV) of OVC and can discriminate among borderline tissues, we investigated the properties of this marker after chemotherapy for early-stage OVC. Advanced OVC treatment involves explorative celioscopic surgery followed by neoadjuvant treatment with paclitaxel and platinum or with carboplatin and paclitaxel (Lhomme et al. 2009) if carcinosis is visible during the explorative celioscopic surgery. Radical surgery is then performed if the chemotherapeutic treatment efficiently removes the entire genital tract. The 5-year survival rate remains poor at approximately 40 % (Kehoe 2008; Tanner et al. 2012). The responders will relapse approximately 18 months after completing first-line therapy and will require further systemic therapy. The median survival of patients with recurrent OVC ranges from 12 to 24 months. The traditional clinical measures of relapse include disease progression (usually defined as a 25 % or greater increase in tumor size), appearance of new lesions and death. In this context, it is important to have an easily executed, highly reliable procedure. We investigated the expression of our proposed marker in the cancerous regions of interest by comparing the molecular profiles of small cancerous tissue areas with those of benign areas from the same tissue section. Extracting the marker compounds from the regions of interest was challenging due to the small size of the cancerous or benign regions.

To access a small polar protein with an m/z ratio of 9,744, we previously developed a sample preparation method using hexafluoroisopropanol (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; HFIP) solvent, which is optimal for polar or high-mass proteins, for protein solubilization (El

Table 1 This cohort was established 6 years ago through collaboration between FABMS and Hospital Jeanne de Flandre, CHRU Lille and consisted of 179 specimens

Pathology type	MALDI-MSI, identification, validation	MALDI profiling	Immunohistochemistry
Serous cancer			
Stage I	5	8	8
Stage III–IV	35	55*	28**
Relapse	5	10	5
Mucinous cancer			
Stage III–IV	10	25	15
Borderline	10	12	10
Benign	43	68*	19**

The sample collection was performed with institutional review board approval (CCP Nord Ouest IV, CP 10/05 then CP 10/12). All of the human tissues were resected by a surgeon affiliated with FABMS, preserved immediately in isopentane, placed in nitrogen, and stored at -80°C until analysis. The data from this cohort have been previously published (El Ayed et al. 2010; Franck et al. 2009a; Lemaire et al. 2005, 2007b; Stauber et al. 2006)

* 25 OVC versus 23 benign were identified previously

Ayed et al. 2010; Franck et al. 2010). This technique has been preferred over classical methods (Redeby et al. 2004, 2006). Using this method, the Reg-alpha C-terminal fragment was detected in early-stage (stage I) serous OVC and in patients who present with OVC recurrence after chemotherapy. Therefore, the fragment can be considered a marker for tumor relapse. This work provides evidence that Reg alpha is a novel OVC biomarker and that MALDI-MSI tissue profiling is useful for early-stage OVC diagnosis and for evaluating the prognosis of OVC patients.

Materials and methods

Materials

Sinapinic acid (SA), trifluoroacetic acid (TFA), and HFIP were obtained from Sigma-Aldrich and used without further purification. Water, acetonitrile, methanol, ethanol, and acetone were provided by Biosolve. The anti-Reg-alpha polyclonal antibodies were purchased from Invitrogen. The secondary antibodies for fluorescence microscopy were provided by Jackson, and the mounting medium was obtained from Vectashield.

Samples

The tissues (179 samples, Table 1) were obtained with informed consent and institutional review board approval (CCP Nord Ouest IV, CP 10/12) from patients undergoing ovarian tumor resection at the Hospital Jeanne de Flandre. The patient information collected included age, treatment received before and after surgery, extent of surgery, current status (i.e., alive, alive with progressive disease, deceased, and cause of death), and survival from the time of the original pathological diagnosis. The samples were collected during the surgery, immediately frozen in -50°C isopentane, and stored at -80°C until analysis. Typically, 10- μm sections were cut using a cryostat and thaw-mounted on flat electrically conductive sample slices (indium tin oxide). The histopathological diagnoses were performed by a pathologist (O.K.) who was blinded to the original clinical diagnosis using subsequent H&E-stained sections.

Tissue preparation

The frozen 10- μm ovarian sections were sliced on a cryostat and immediately transferred onto conductive indium tin oxide (ITO) glass (Bruker Daltonics, Wissensbourg, France). The tissues were dried using a desiccator, and the sections were washed for 1 min in an acetone solution, 15 s in a 70 % ethanol solution, 15 s in a 95 % ethanol solution, and 1 min in chloroform.

Microscopy methods

Hematoxylin–eosin–safranin staining

For the hematoxylin–eosin–safranin (HES) staining, the sections were heated for 5 min and stained with hematoxylin for 3 min. The sections were rinsed with water prior to being bathed twice in a solution containing 156 mL of 95 % EtOH, 44 mL of H_2O and 80 μL of HCl. The sections were rinsed in H_2O , a solution of 0.48 mL of 35 % NH_4OH and 200 mL of H_2O , and H_2O for an additional 5 min each. The sections were then rinsed in 80 % ethanol, stained with eosin for 10 s, and washed twice with 95 % ethanol and twice in 100 % ethanol. Finally, the sections were stained with safranin (10 g/L in 100 % EtOH) for 6 min and washed twice in 100 % EtOH and once in xylene for 1 min.

Fluorescence microscopy

The sectioned tissues were pre-incubated with a PBS buffer containing 1 % BSA, 0.05 % Triton, 1 % ovalbumin, and 1 % normal goat serum (NGS) for 30 min and then incubated with a specific rabbit polyclonal anti-C-terminal Reg-alpha antibody that was diluted to 1/100 with a PBS solution containing 1 % BSA, 0.05 % Triton X-100, 1 % NGS, and 1 % ovalbumin (AB solution). A total of 500 μL of the antibody solution was added to each tissue section, and the sections were incubated overnight at 4°C . After washing three times with PBS, the samples were incubated for 1 h at room temperature with goat anti-rabbit goat antibody (Invitrogen) conjugated to Alexa Fluor 488 (1:2,000 in the AB solution), rinsed with PBS, and mounted with Glycergel (Sigma Life Science, USA). The samples without primary antibody were used as negative controls. The slides were maintained in the dark at 4°C until observation and analysis with an inverted Leica DM IRE 2 microscope. The light exposition was 100 ms.

Immunohistochemistry

The immunohistochemistry (IHC) was performed on paraffin-embedded ovarian tissues using a standard peroxidase-based staining method. The paraffin-embedded 4- μm tissue sections were cut on a microtome and dried for 12 h at 60°C , dewaxed with 100 % xylene for 5 min, and rehydrated in brief successive baths of 100 % alcohol, 95 % alcohol, and distilled water. The tissue sections were stored in distilled water until the following steps were performed. The endogenous peroxidase activity was quenched with 10 % H_2O_2 for 5 min. The tissue sections were incubated with the primary anti-Reg alpha C-term antibody (Zymed Laboratories, Invitrogen, ref. 3-2400) at a dilution of 1/50 in TBS (50 mM, pH 7.4) for 1 h at room temperature. The tissue sections were washed with TBS

and successively incubated with the secondary antibody (biotin–streptavidin peroxidase, horseradish peroxidase (HRP) conjugate) and the chromogen (3,3'-diaminobenzidine) following the manufacturer's protocol (streptavidin-HRP, Southern Biotechnology and Associates, Inc.). The nuclei were counterstained with hematoxylin.

Mass spectroscopy methods

HFIP extraction method

To extract compounds from the small-area stage I tissue biopsies, a hydrophobic solvent was used following the procedure previously described by our group (Franck et al. 2010; van Remoortere et al. 2010). A total of 10 mg of SA was dissolved in 1 mL of HFIP. A total of 3 μ L of the solution was manually dropped onto the region of interest in 6 0.5- μ L droplets. After this deposition, 3 μ L of 10 mg/mL SA in 1 % ACN/aqueous TFA (7:3) was added.

The same procedure was used to extract compounds from the large-area stage III and IV tissue biopsies, except that a total of 10 μ L of SA in HFIP was dropped onto the tissue section in 5 2- μ L droplets. A total of 10 μ L of SA in 0.1 % ACN/TFA 7:3 was added.

Tissue profiling using MALDI mass spectrometry

The molecular profiling was performed on an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a micro-channel plate (MCP) detector. The instrument was equipped with a Smartbeam™ laser and controlled by FlexControl 3.0 (Build 158) software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). For the stage I tissue biopsies, the raw spectra were compared using the FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The spectra from the stage III and stage IV biopsies were processed with the FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using the convex hull baseline subtraction method. The spectra were recorded in positive ion, linear time-of-flight mode. For these experiments, the laser offset was typically set to 30 %, the laser range was set to 20 %, the laser fluence was set to 50 %, and the laser focus was set to small.

Results

Using MALDI-MSI followed by classical proteomic methods, we previously identified from 25 OVC (stage III and IV) and 23 benign ovarian tissues, the C-terminal Reg-alpha fragment marker (Table 1). This marker has been validated by Western blot (9 OVC (stage III and IV) versus 16 benign

ovarian tissues) (Lemaire et al. 2007b). A new strategy to investigate this marker at different OVC stages and grades has been developed (Table 1). We investigated the expression of this marker in the cancerous regions of interest by comparing the molecular profiles of small cancerous tissue areas with normal areas from the same tissue section. Extracting marker compounds in the regions of interest was challenging due to the small size of the cancerous and benign regions. Therefore, we developed a procedure that improved compound extraction from small regions of interest by using the HFIP extraction buffer (El Ayed et al. 2010; Franck et al. 2010). HFIP is applied directly to the tissue to improve polar protein extraction. The mass spectra of the classical MALDI mass spectrometry imaging and the profiling procedure using only SA without HFIP on the tissue extractions demonstrate that the C-terminal Reg-alpha fragment with an m/z ratio of 9,744 is either not detected or not clearly distinguishable from the chemical spectral background (Fig. 1). The spectral differences observed when detecting this fragment in a 5-mm cancerous region from stage I OVC serous tissue (Fig. 2) using the HFIP extraction (Fig. 1a) or classical matrix deposition procedure (Fig. 1b) confirmed this hypothesis. The ion at 9,744 can be easily detected in small tissue fragments using the HFIP procedure (Fig. 1a), whereas only a small SA peak is detected without HFIP (Fig. 1b).

The C-terminal Reg-alpha fragment is a specific OVC-diagnosis marker

We first validated our on-tissue extraction procedure using the late-stage OVC samples. Under these conditions, 30 stage IIIc and IV serous OVCs versus 45 benign were analyzed by MALDI-MS profiling after on-tissue extraction (Fig. 2a). The mass spectra focused on the ion at 9,744, which corresponds to the C-terminal Reg-alpha fragment and was present in all of the ten stage IIIc or IV serous adenocarcinomas (ADK, Fig. 2a). We validated these results on 12 patients using immunohistochemistry (IHC) (Figs. 3, 4). Among these 12 patients, 7 OVC were diagnosed (2 of which were on the same specimen or on the same cut) and 2 demonstrate a well-differentiated morphology (one benign or typically benign and malignant morphologies). Moreover, among the seven ovarian cancers, there was an endometrioid carcinoma of which a large area of the specimen was found to be an undifferentiated carcinoma. The two sections amount to two different ovarian cancers on the same ovary. A total of 15 samples were tested: 8 malignant and 7 benign (Figs. 3, 4). The signal was consistently balanced, with a cytoplasmic localization in the cancer cases (87.5 % were balanced, n = 7/8 with cytoplasmic labeling specifically in the endometrioid carcinomas) and a predominantly nuclear localization in the benign tumors (96 % nuclear labeling) (Table 2).

Fig. 1 The spectral differences observed between the classical and HFIP protein extraction methods from small tissue sections. a The profiling spectrum obtained from a 4-mm cancerous region of a stage I serous cancerous tissue using the HFIP procedure; b the spectrum generated with the classical drop-of-SA method. With the classical drop method, the C-terminal Reg-alpha fragment is not clearly distinguishable from the background. In contrast, this fragment is readily apparent using the HFIP procedure

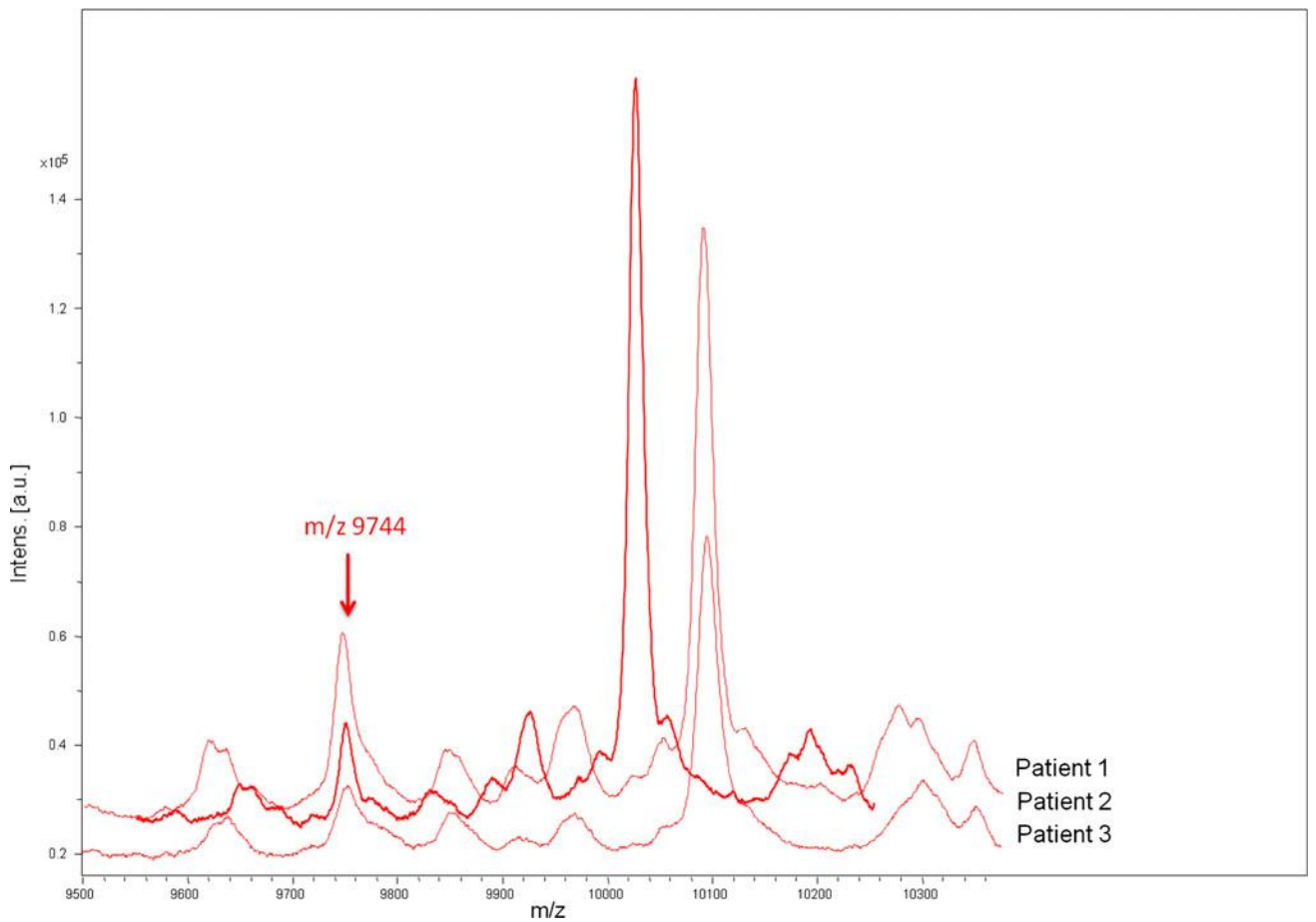
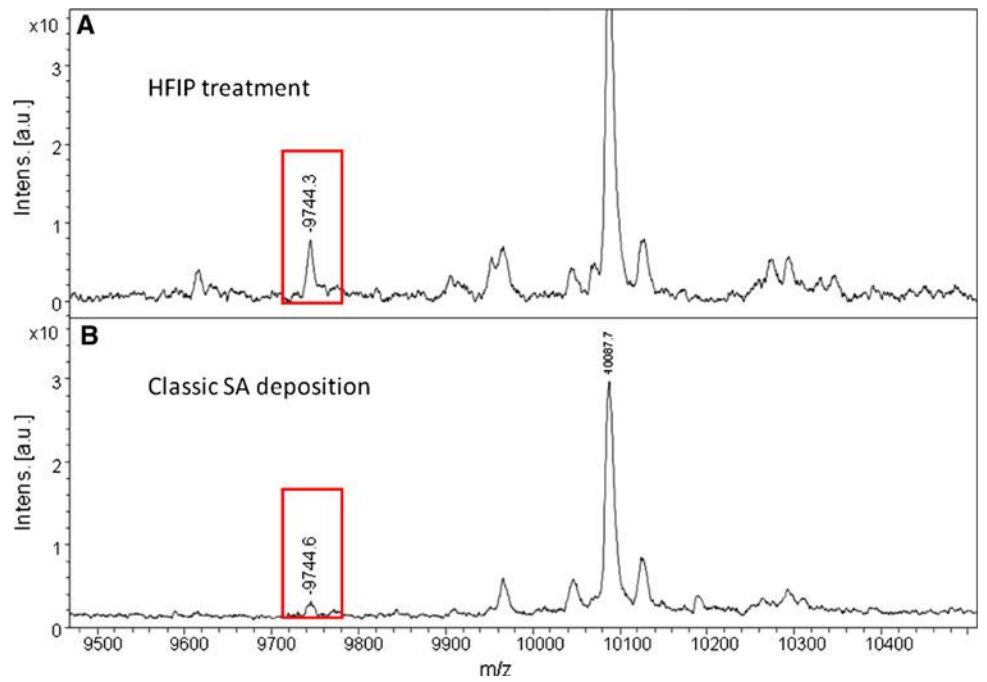


Fig. 2 MALDI-MS spectra of the HFIP extracts from the carcinoma regions of three different stage III–IV patients. The ion with an m/z ratio of 9,774 corresponds to the C-terminal Reg-alpha fragment, which is found in each patient and indicated by an arrow

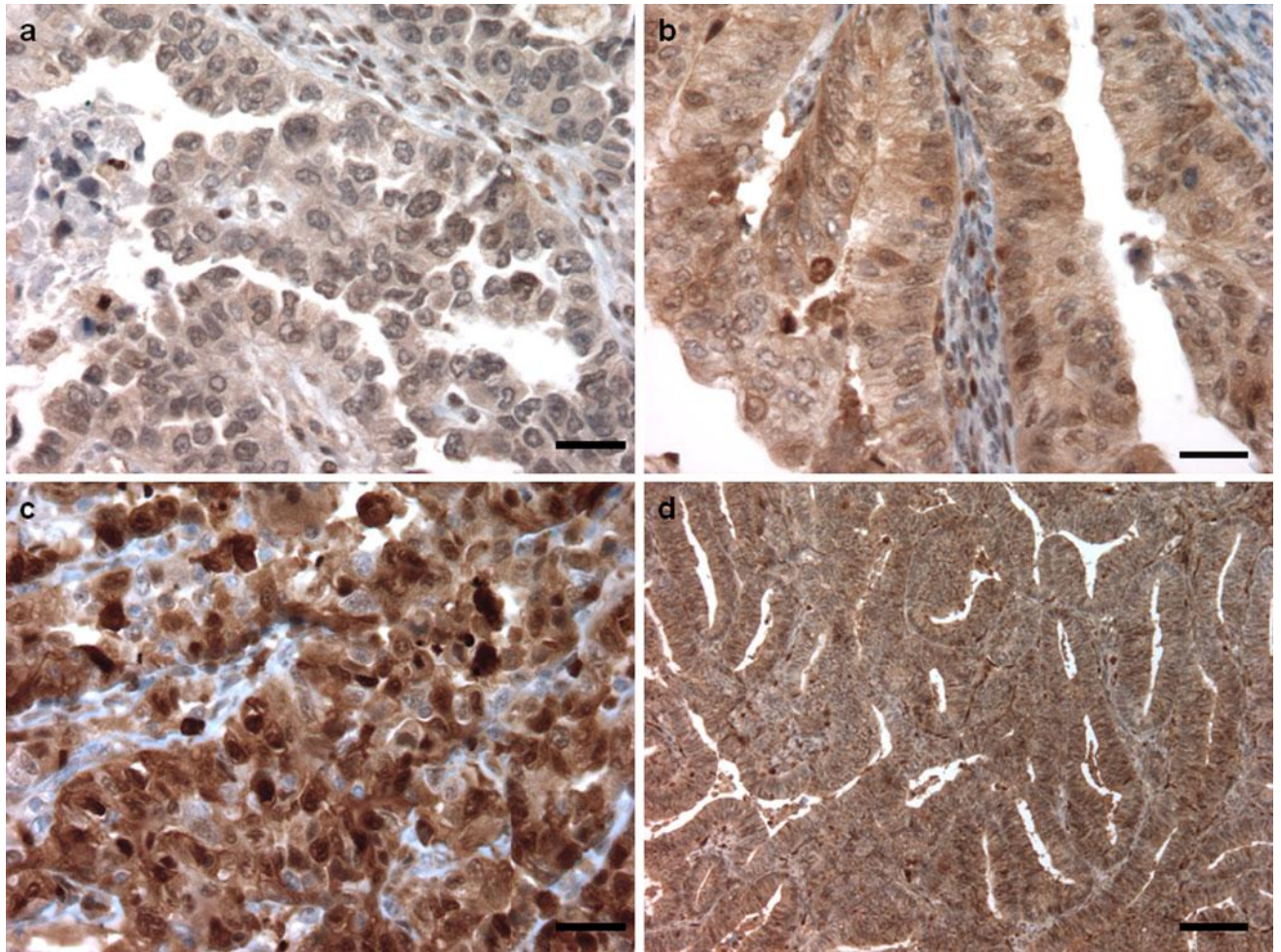


Fig. 3 Immunohistochemical studies using a polyclonal antibody directed against the C-terminal portion of the Reg-alpha fragment. This study was performed on 12 different samples (see Table 2). This set of pictures represents carcinoma tissues. a Papillary clear-cell

carcinoma (scale bar 50 μ m). b Epithelial cells of immunolabeled serous carcinoma (scale bar 50 μ m). c Epithelial cells of immunolabeled serous poorly differentiated carcinoma (scale bar 50 μ m). d Endometrioid carcinoma (scale bar 50 μ m)

The difference in cellular localization based on the benign or malignant character of the epithelial samples is illustrated in Figs. 3 and 4. Moreover, in these surface epithelial–stromal tumors types, both epithelial and stroma cells are labeled in IHC with the anti-C-terminal Reg-alpha antibody. It is now possible to discriminate through the localization of the labeling (nuclear vs. cytoplasmic), these tumors which are a class of ovarian neoplasms that may be benign or malignant. It has to be noted that in this group of tumors serum CA-125 is often elevated but is only 50 % accurate, so it is not a useful tumor marker to assess the progress of treatment. We have now a novel marker, Reg alpha, which completes the diagnosis. Statistical analyses performed for this marker at different OVC stages reflect a prevalence of 77.66 ± 8.77 (with a correlation coefficient value of $p \setminus 0.001$ of 0.601 between OVC and benign tissue) (Table 3).

Considering this strict difference, we then investigated the presence of C-terminal Reg-alpha fragment in the

borderline tissues (Fig. 5). Ten tissues were investigated in IHC. The borderline cysts (Fig. 5) revealed strong labeling in the cytoplasm and nucleus, which indicated a malignant diagnosis for these samples. The HFIP-based MALDI profiling analyses for the 12 samples (Fig. 6) confirm the presence of the marker in the malignant portion, and its absence in the healthy portion of the ovary (Fig. 6) confirmed the specificity and usefulness of Reg alpha for diagnosing borderline tumors. Thus, the presence of the Reg-alpha C-terminal fragment with an m/z ratio of 9,744 confirms the malignant character of the tissue.

The C-terminal Reg-alpha fragment is a specific OVC-relapse diagnosis marker

Treatment for advanced OVC involves an explorative celioscopic surgery followed by a neoadjuvant treatment

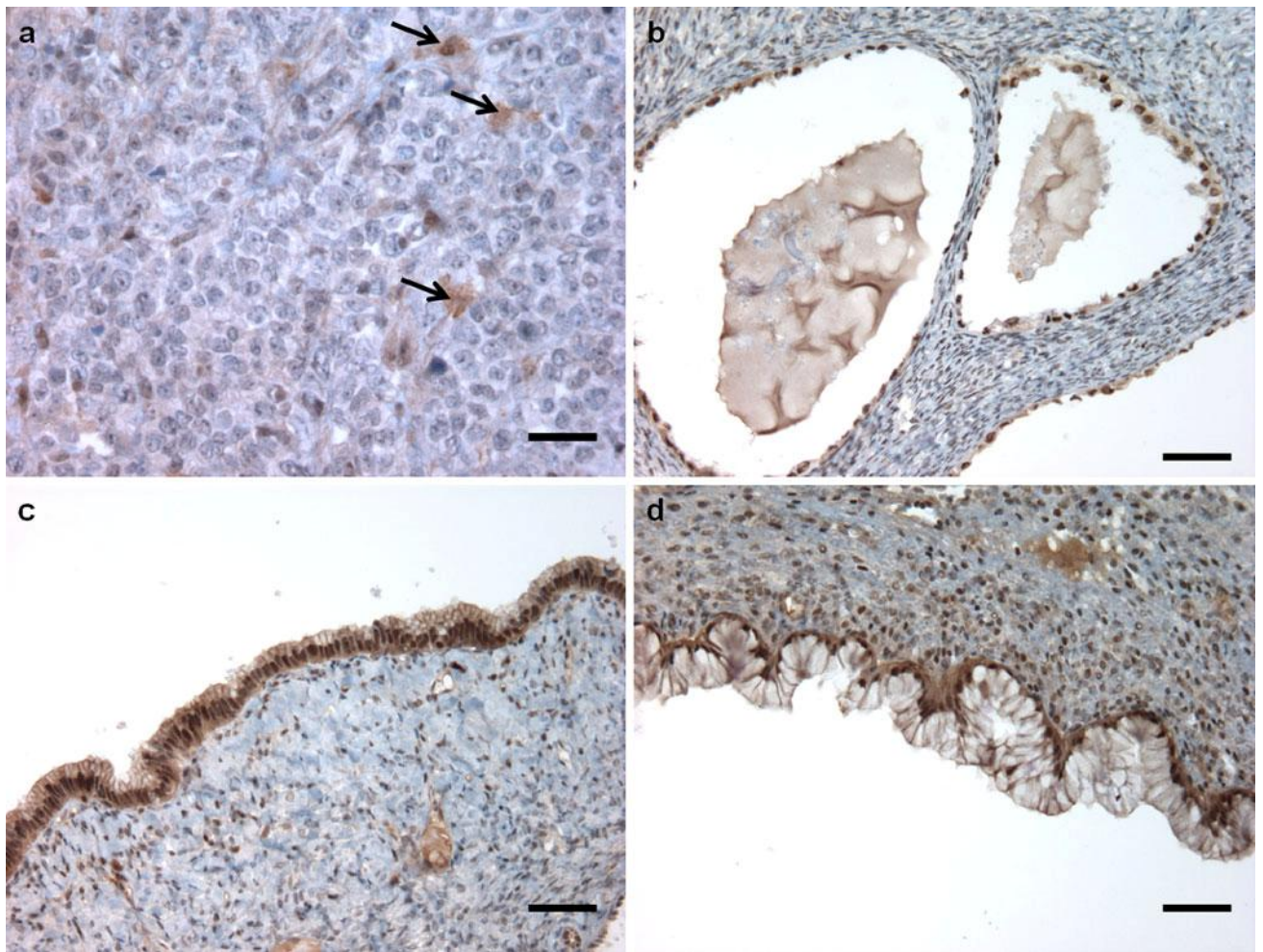


Fig. 4 Immunohistochemical studies using a polyclonal antibody directed against the C-terminal portion of Reg alpha. This study was performed on 12 different samples (see Table 2). This set of pictures represents carcinoma and benign tissues. a Epithelial cytoplasmic labeling of the undifferentiated contingent on the endometrioid

carcinoma (scale bar 50 μ m). b Mucinous invasive carcinoma (scale bar 200 μ m). c Serous cystadenomas (benign ovary tissue; scale bar 50 μ m). d Mucinous cystadenocarcinoma (benign ovary tissue; scale bar 50 μ m)

with paclitaxel and platinum, or carboplatin with taxol (Lhomme et al. 2009) if carcinosis is visible during the explorative celioscopic surgery. The patients for whom this chemotherapy was effective had their reproductive organs (i.e., ovaries, fallopian tubes, and uterus; Table 4) completely removed at least 10 months after the initial diagnosis. The 5-year survival remains poor at about 40 % (Kehoe 2008; Tanner et al. 2012). The responders will relapse within approximately 18 months after completing first-line therapy and require further systemic therapy. The median survival of patients with recurrent ovarian cancer ranges from 12 to 24 months. Traditional clinical measures of relapse include disease progression, usually defined as a 25 % or greater increase in tumor size, appearance of new lesions, or death.

In this context, ten patients were surgically explored by celioscopy. The carcinosis samples from the first surgery or

the ovarian samples from the second surgery were analyzed for tumor recurrence by tracking the C-terminal Reg-alpha fragment using MALDI-MS profiling (Fig. 7). The C-terminal Reg-alpha fragment was present in the mass spectra of these patients. In patient 97, for example, the chemotherapeutic treatment was completely ineffective. In this patient, all of the samples taken during the exploratory celioscopy (the second surgery) were malignant, and the C-terminal Reg-alpha fragment was found in all of the biopsies. For patients 66 (Fig. 7 see inset 66) and 81, the relative efficacy of the chemotherapy allowed the surgeon to perform the radical surgery; however, the patients are still under surveillance. A biopsy from patient 75 that was collected 7 months after the treatment also presented a small peak with an m/z ratio of 9,744, confirming that the tumor was still present and that relapse might be beginning (Fig. 7; see inset 75). Consequently, this patient received

Table 2 The immunohistochemistry results from 12 patients

	Patients	Pathologist diagnosis	Epithelial labeling intensity	Cellular localization of the labeling	Stroma reaction
Ovarian cancer	1	ADK	Strong	Cytoplasmic and nuclear	Low and nuclear
	2	Papillary carcinoma	Strong	Cytoplasmic and nuclear	Low and nuclear
	3	Mucinous ADK	Strong	Cytoplasmic and nuclear	Low and nuclear
	4	Serous ADK less differentiated	Strong	Cytoplasmic and nuclear	Low and nuclear
	5	ADK less differentiated invasive	Strong	Cytoplasmic and nuclear	Low and nuclear
	6	Borderline cyst	Strong	Cytoplasmic and nuclear	Low and nuclear
	7	Endometrioid ADK	Strong	Cytoplasmic and nuclear	Low and nuclear
	8	Endometrioid ADK	Strong	Cytoplasmic and nuclear	Low and nuclear
Benign ovarian tumors	1	Serous cystadenocarcinoma	Strong	Nuclear	Low and nuclear
	2	Adenocarcinoma borderline	Strong	Nuclear	Low and nuclear
	3	Benign part of serous ADK	Low	Nuclear	Low and nuclear
	4	Serous cystadenocarcinoma	Low	Nuclear	Low and nuclear
	5	Leiomyoma	Low	Nuclear	Low and nuclear
	6	Mucinous cystadenocarcinoma	Strong	Nuclear	Low and nuclear
	7	Serous cyst	Strong	Nuclear	Low and nuclear

The immunohistochemistry used an antibody directed against the C-terminal fragment of the 11s proteasome activator complex (PA28, Reg alpha)

Table 3 Statistical analyses of detection of Reg-alpha marker in the different cases

Pathology type	Statistical prevalence of the C-terminal fragment (%); (time detection/number of samples)
Serous cancer	
Stage I	66 %; (14/21)
Stage III–IV	80.5 %; (95/118)
Relapse	88 %; (22/25)
Mucinous cancer	
Stage III–IV	82 %; (41/50)
Borderline	71.8 %; (23/32)
Benign	20 %; (26/130)

The method used for statistics takes into account all techniques used for the detection of this marker. This includes MALDI profiling, IHC, Western blot, nano-LC-IT-MS, and MALDI-MSI. Considering the technique used, this marker is detected at 73 % in IHC, 89 % in MALDI profiling, and 77 % in MALDI-MSI combined with Western. MALDI profiling seems to be the best technology to detect this marker. The variation intra-assay of the detection of this marker is 12 % between OVC and benign tissues

radical surgery and is now under surveillance. The positive control for the experiment was the detection of the C-terminal Reg-alpha fragment in the mass spectra of patients 67 and 79, who had BRCA1 genetic mutation and breast cancer. Pathology-based recidivism was observed in patient 66 (Fig. 7 see inset 66), confirming that the presence of the C-terminal Reg-alpha fragment could be used to evaluate pathological resurgence or persistence. This

demonstrates that this marker (C-terminal fragment of Reg alpha) can detect tumor recurrence and can be used to monitor relapse and treatment efficacy. This marker presents a prevalence of 88 % in the case of tumor relapse (Table 4).

The C-terminal Reg-alpha fragment is a specific early-stage OVC-diagnosis marker

A good marker for disease screening must be found in the early stages of disease development. We obtained stage I surgical tissues from different types of OVCs. We then investigated the C-terminal Reg-alpha fragment in the cancerous regions of interest by comparing the molecular profiles of small areas of cancerous tissue with normal areas from the same tissue section. Due to the difficulty of diagnosis at the early stage of pathology, this study was performed on eight collected tissues. Figures 8 and 9 show the restricted size of the diseased areas from stage 1a and stage 1c serous OVC biopsies, respectively. The relative spectra acquired in each cancerous and benign tissue zone focus on the mass range of Reg alpha and confirm that it is present only in the OVC cells. The spectra clearly show that this marker is specifically localized in the cancerous regions of the OVC tissue and is absent in the benign tissue areas. The immunofluorescence data confirmed the localization of the C-terminal Reg-alpha fragment in the three cells of the acini (Fig. 8; see inset picture). Moreover, we confirmed the presence of Reg alpha in stage I tissues from the most frequent OVC-epithelial cancer types:

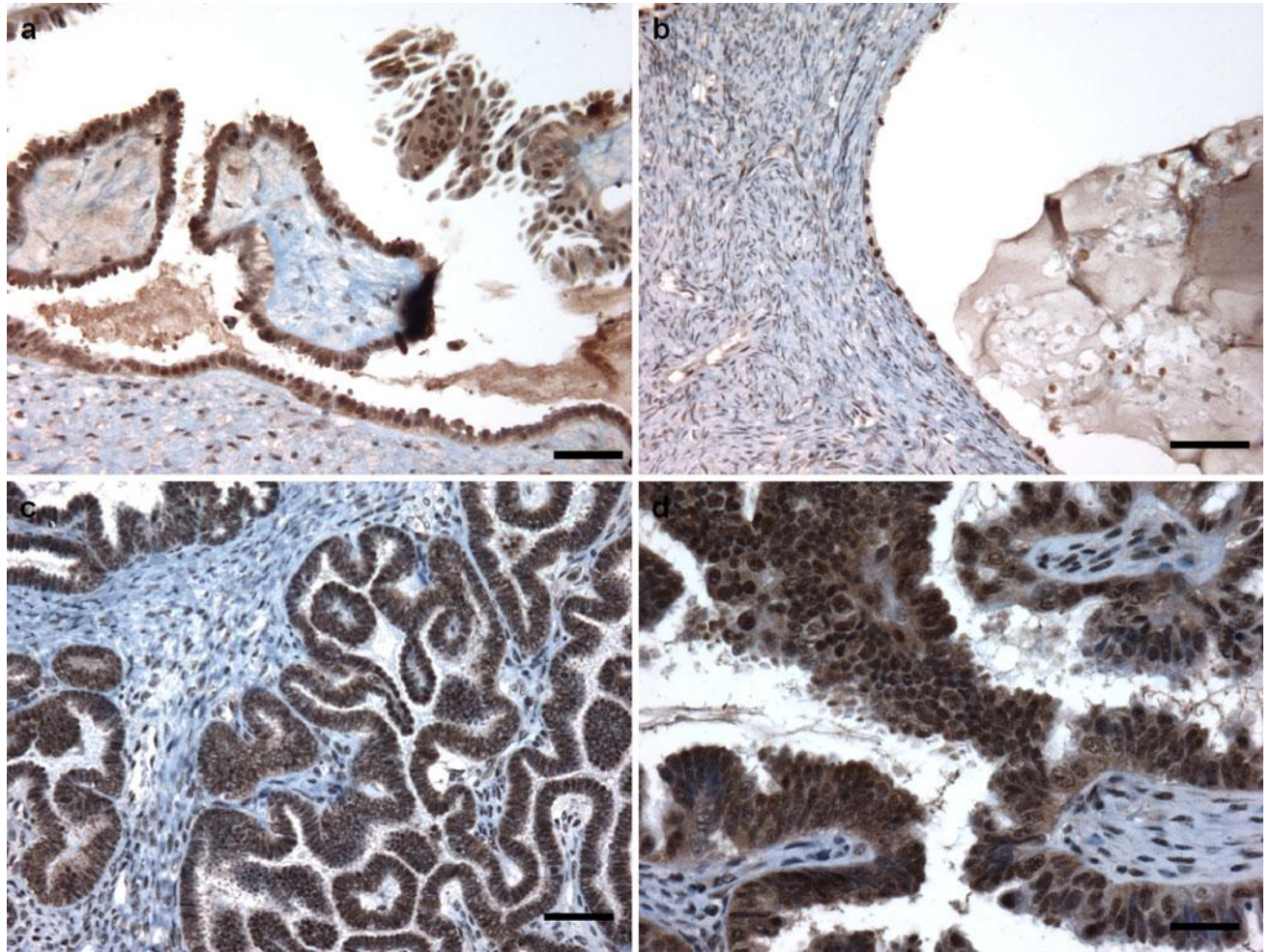


Fig. 5 Immunohistochemical studies using a polyclonal antibody directed against the C-terminal portion of Reg alpha. This study was performed on samples from 12 different patients (see Table 2). This set of pictures represents borderline tissues. a A borderline malignant

cyst (scale bar 50 μ m). b Borderline adenocarcinoma tissue (benign tissue; scale bar 200 μ m). c Borderline malignant mucinous tissue (scale bar 200 μ m). d Borderline malignant mucinous tissue (scale bar 50 μ m)

endometrioid (Fig. 9), which represents 15 % of epithelial OVC cases; mucinous OVC (Fig. 10), which represents 5 % of OVC cases; and serous OVC (Fig. 2), which represents 80 % of OVC cases. We also found this marker in borderline mucinous tissue. Statistically, Reg alpha is detected at $81.25\% \pm 1.06$ in stage III–IV and 80.5 % in stage I of OVC (Table 3). The correlation coefficient for all OVC stages is $p < 0.001$ of 0.998.

Discussion

These data confirmed that our novel method was useful for rapid diagnosis using small pieces of tissue taken from extemporaneous biopsies. This procedure can be used for extemporaneous biopsies and will help pathologists provide a diagnosis. Indeed, the extemporaneous analysis of

tissue sections usually relies on a simple visual evaluation of the HES section of the biopsy. The final pathological reports confirm the initial diagnosis using IHC for known pathological biomarkers, such as P53 and HER2/neu, and are only available 1 week later. This rapid and simple method can be used for fast tissue marker analysis that provides additional disease information to the pathologist and the surgeon for use in the extemporaneous analysis that will be followed by the IHC-based final report.

Therefore, the C-terminal Reg-alpha fragment biomarker has been detected in early- and late-stage OVC using MALDI mass spectrometry profiling with a specific HFIP extraction procedure. The presence of Reg alpha in certain borderline tissues illustrates its usefulness in cases that are difficult to diagnose. This marker can also be used to evaluate cancer treatment, and its presence in patients after chemotherapy and tumor relapse confirms that this

Fig. 6 MALDI-MS spectra of the HFIP extracts from a mucinous borderline region. The ion with an m/z of 9,774 ratio corresponds to the C-terminal Reg-alpha fragment and is indicated by an arrow. The HFIP extraction from the healthy region confirmed the absence of the ion at an m/z of 9,774, validating the specificity of the C-terminal fragment detection. These data demonstrate that this borderline tissue is malignant. The inset illustrates hematoxylin and eosin (H&E) staining of the tissue subjected to MALDI-MS profiling analyses (scale bar 5 mm)

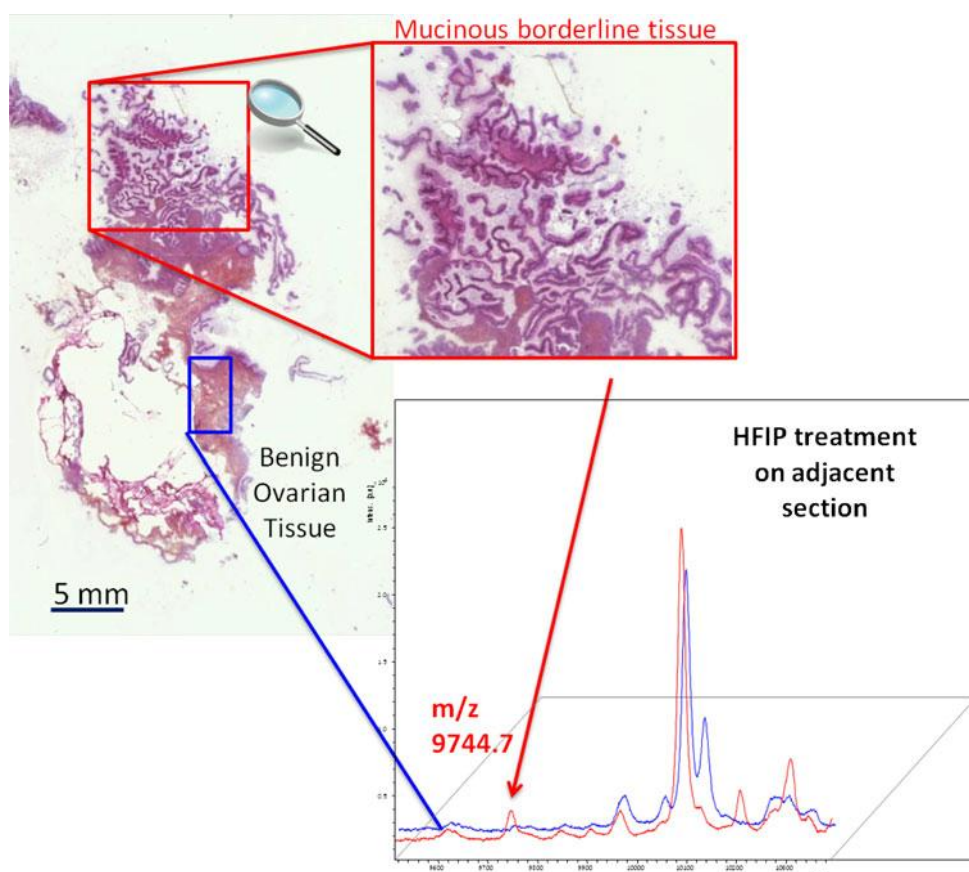


Table 4 The characteristics of the patients from whom tissue was collected after neoadjuvant chemotherapy

Patient number	Patient age	Observations	Type of treatment	Time between the diagnosis and second surgery (months)
58	58		6 Cycles of carboplatin/taxol Complete surgery	4
65	61		6 Cycles of carboplatin/taxol Complete surgery	10
66	69		6 Cycles of carboplatin/taxol Complete surgery carboplatin/Caelyx	15
67	55	Mutation BRCA1	4 Cycles of carboplatin/taxol Complete surgery	8
69	63		2 Cycles of carboplatin/taxol 4 Cycles of carboplatin/taxol Complete surgery	8
75	60		2 Cycles of carboplatin/taxol 6 Cycles of carboplatin/taxol Complete surgery	7
79	59	Mutation BRCA1 and breast cancer associated	6 Cycles of carboplatin/taxol Radiotherapy and herceptin	1
81	48		6 Cycles of carboplatin/taxol Complete surgery	11
95	65		6 Cycles of carboplatin/taxol Taxol	12
97	59		6 Cycles of carboplatin/taxol Taxol	18

Fig. 8 MALDI-MS spectra of HFIP extracts from stage 1a serous OVC biopsies. The C-terminal Reg-alpha fragment (m/z 9,744) is detected in the acini cells. The inset shows fluorescent immunocytochemistry data using the anti-C-terminal Reg-alpha fragment and hematoxylin and eosin (H&E) staining of the tissue subjected to MALDI-MS profiling analyses (scale bar 5 mm)

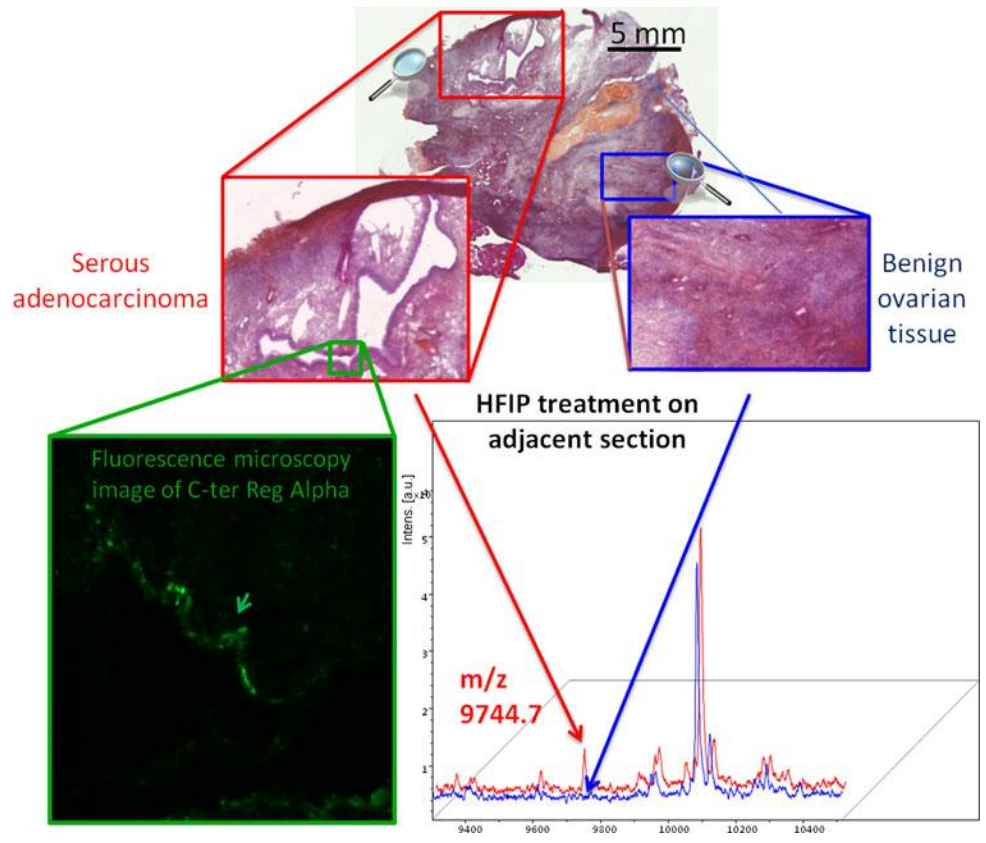


Fig. 9 MALDI-MS spectra of HFIP extracts from stage 1c serous OVC biopsies. The C-terminal Reg-alpha fragment (m/z 9,744) is detected in the OVC cells. The inset shows the hematoxylin and eosin (H&E) staining of the tissue subjected to MALDI-MS profiling analyses (scale bar 5 mm)

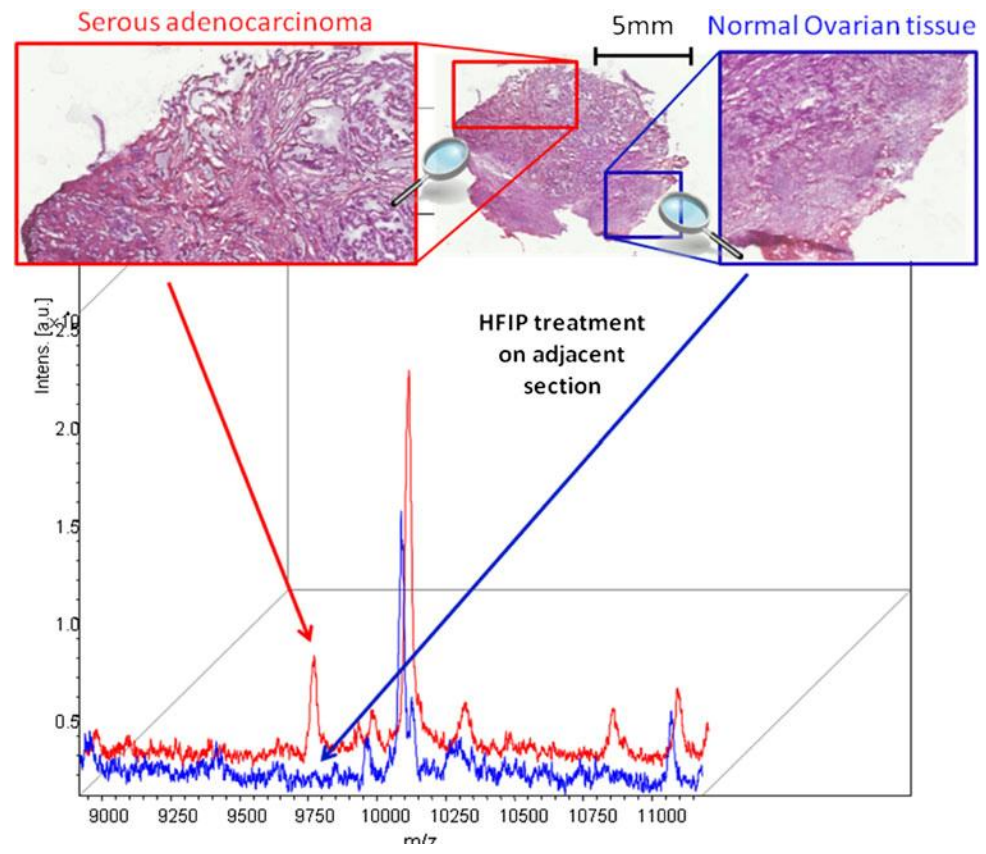
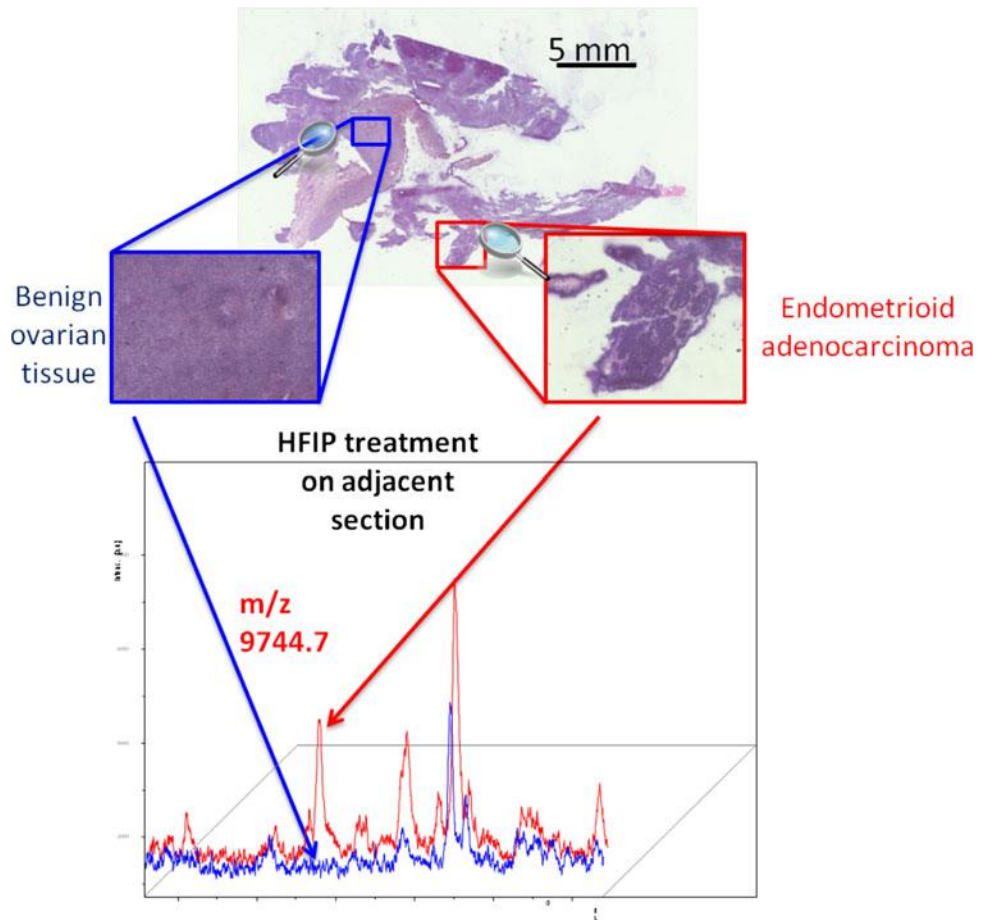


Fig. 10 MALDI-MS spectra of HFIP extracts from stage 1c endometrioid OVC biopsies or from healthy adjacent tissue. The C-terminal fragment of Reg-alpha (m/z 9,744) is detected in the tumor sample. The inset shows the hematoxylin and eosin (H&E) staining of the tissue subjected to MALDI-MS profiling analyses (scale bar 5 mm)



a paclitaxel and carboplatin combination for sensitive (6 months) patients is currently used after phase I (Ushijima 2010). Patients with persistent ovarian cancer have cancer cells that are detected after initial surgery and first-line chemotherapy. Persistent ovarian cancer is detected by elevated serum CA-125, abnormal X-rays and CT scans, or a biopsy performed during a second-look laparotomy. The standard course of the initial chemotherapy is approximately six cycles (or 4 months of treatment). It is thus important to have good tumor-relapse markers to evaluate whether the first-line treatment is sufficient or whether a second cycle of chemotherapy is necessary. In this context, the C-terminal Reg-alpha fragment is a good candidate for evaluating tumor treatment resistance. In fact, the marker is useful soon after treatment, because it can be detected 1 month after 6 cycles of carboplatin/Taxol followed by pharmacologic treatments (Table 3). This marker can also be used in conjunction with mucin-9, which we have previously identified in tumors (El Ayed et al. 2010; Franck et al. 2009a) and in patients' serum (Maines-Bandiera et al. 2010). Notably, the C-terminal Reg-alpha fragment has also been detected in ascites fluid (El Ayed, unpublished data). Therefore, these two markers can be used to track the therapeutic efficacy.

Acknowledgments This study was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to IF), Institut du Cancer (INCA to IF), Institut de Recherche en Santé du Canada (ISRC to MS & RD), Ministère du Développement Économique de l'Innovation et de l'Exportation (MDEIE to R.D), Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS to R.D), C.H.R. U. Lille (to CB) and Région Nord-Pas de Calais (to RL). R.D. is a member of the Centre de Recherche Clinique Etienne-Le Bel (Sherbrooke, QC, Canada).

References

- Bonnel D, Longuespee R, Franck J, Roudbaraki M, Gosset P, Day R, Salzet M, Fournier I (2011) Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer. *Anal Bioanal Chem* 401:149–165
- Caprioli RM, Farmer TB, Gile J (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 69:4751–4760
- Cornett DS, Mobley JA, Dias EC, Andersson M, Arteaga CL, Sanders ME, Caprioli RM (2006) A novel histology-directed strategy for MALDI-MS tissue profiling that improves throughput and cellular specificity in human breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 5:1975–1983
- Djidja MC, Claude E, Snel MF, Francese S, Scriven P, Carolan V, Clench MR (2010) Novel molecular tumour classification using

- MALDI-mass spectrometry imaging of tissue micro-array. *Anal Bioanal Chem* 397:587–601
- El Ayed M, Bonnel D, Longuespee R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M (2010) MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Med Sci Monit* 16:BR233-245
- Franck J, Arafah K, Elayed M, Bonnel D, Vergara D, Jacquet A, Vinatier D, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M (2009a) MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 8:2023–2033
- Franck J, El Ayed M, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I (2009b) On-tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies. *Anal Chem* 81:8305–8317
- Franck J, Longuespee R, Wisztorski M, Van Remoortere A, Van Zeijl R, Deelder A, Salzet M, McDonnell L, Fournier I (2010) MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. *Med Sci Monit* 16:BR293–299
- Kehoe S (2008) The management of ovarian carcinoma. *Minerva Ginecol* 60:155–164
- Longuespée R, Charlotte B, Kerdraon, O, Vinatier D, Fournier I, Day R, Salzet M (2012) MALDI MSI and ovarian cancer biomarkers. *Adv Cancer Manag Ed Mohan R*:211–236
- Khalil I, Brewer MA, Neyarapally T, Runowicz CD (2010) The potential of biologic network models in understanding the etiopathogenesis of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 116:282–285
- Lambaudie E, Collinet P, Vinatier D (2006) Ovarian cancers and CA 125 in 2006. *Gynecol Obstet Fertil* 34:254–257
- Lemaire R, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Tabet JC, Salzet M, Fournier I (2005) New developments in direct analyses by MALDI mass spectrometry for study ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics* 4:S305–S308
- Lemaire R, Tabet JC, Ducoroy P, Hendra JB, Salzet M, Fournier I (2006a) Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* 78:809–819
- Lemaire R, Wisztorski M, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I (2006b) MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem* 78:7145–7153
- Lemaire R, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I (2007a) Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Proteome Res* 6:1295–1305
- Lemaire R, Menguellet SA, Stauber J, Marchaudon V, Lucot JP, Collinet P, Farine MO, Vinatier D, Day R, Ducoroy P, Salzet M, Fournier I (2007b) Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *J Proteome Res* 6:4127–4134
- Lhomme C, Even C, Morice P, Balleyguier C, Petrella M, Gouy S, Uzan C, Duvillard P, Pautier P (2009) First line chemotherapy of advanced epithelial ovarian cancer. *Bull Cancer* 96:1207–1213
- Maines-Bandiera S, Woo MM, Borugian M, Molday LL, Hii T, Gilks B, Leung PC, Molday RS, Auersperg N (2010) Oviductal glycoprotein (OVGP1, MUC9): a differentiation-based mucin present in serum of women with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 20:16–22
- McCombie G, Staab D, Stoeckli M, Knochenmuss R (2005) Spatial and spectral correlations in MALDI mass spectrometry images by clustering and multivariate analysis. *Anal Chem* 77:6118–6124
- Pevsner PH, Melamed J, Remsen T, Kogos A, Francois F, Kessler P, Stern A, Anand S (2009) Mass spectrometry MALDI imaging of colon cancer biomarkers: a new diagnostic paradigm. *Biomark Med* 3:55–69
- Redeby T, Roeraade J, Emmer A (2004) Simple fabrication of a structured matrix-assisted laser desorption/ionization target coating for increased sensitivity in mass spectrometric analysis of membrane proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:1161–1166
- Redeby T, Carr H, Bjork M, Emmer A (2006) A screening procedure for the solubilization of chloroplast membrane proteins from the marine green macroalga *Ulva lactuca* using RP-HPLC-MALDI-MS. *Int J Biol Macromol* 39:29–36
- Schwamborn K, Krieg RC, Reska M, Jakse G, Knuechel R, Wellmann A (2007) Identifying prostate carcinoma by MALDI-imaging. *Int J Mol Med* 20:155–159
- Schwartz SA, Weil RJ, Johnson MD, Toms SA, Caprioli RM (2004) Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: feasibility of a new technique for the analysis of protein expression. *Clin Cancer Res* 10:981–987
- Seeley EH, Caprioli RM (2008) Imaging mass spectrometry: towards clinical diagnostics. *Proteomics Clin Appl* 2:1435–1443
- Stauber J, Lemaire R, Wisztorski M, Ait-Menguellet S, Lucot JP, Vinatier D, Desmons A, Deschamps M, Proess G, Rudolf I, Salzet M, Fournier I (2006) New developments in MALDI imaging mass spectrometry for pathological proteomic studies: introduction to a novel concept, the specific MALDI imaging. *Mol Cell Proteomics* 5:S247–S249
- Stauber J, Lemaire R, Franck J, Bonnel D, Croix D, Day R, Wisztorski M, Fournier I, Salzet M (2008) MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. *J Proteome Res* 7:969–978
- Tanner EJ, Black DR, Zivanovic O, Kehoe SM, Dao F, Konner JA, Barakat RR, Lichtman SM, Levine DA (2012) Patterns of first recurrence following adjuvant intraperitoneal chemotherapy for stage IIIC ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 124:59–62
- Ushijima K (2010) Treatment for recurrent ovarian cancer-at first relapse. *J Oncol* 497429
- van Remoortere A, van Zeijl RJ, van den Oever N, Franck J, Longuespee R, Wisztorski M, Salzet M, Deelder AM, Fournier I (2010) McDonnell LA MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue. *J Am Soc Mass Spectrom* 21:1922–1929

Article 6

Proteomic analyses of serous and endometrioid epithelial ovarian cancers: molecular insights of a possible histological etiology

Rémi Longuespée^{1,7*}, Hugo Gagnon^{1,7*}, Charlotte Boyon^{1,2}, Kurstin Strupat³, Claire Daully⁴, Olivier Kerdraon⁵, Adesuwa Ighodaro^{1,6}, Annie Desmons¹, Jocelyn Dupuis⁴, Maxence Wisztorski¹, Denis Vinatier^{1,2}, Isabelle Fournier¹, Robert Day⁷, Michel Salzet^{1**}

1: Université Nord de France, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée, MALDI Imaging Team, EA 4550, Université de Lille 1, Cité Scientifique, 59650 Villeneuve D'Ascq

2: Hôpital Jeanne de Flandre, service de Chirurgie Gynécologique, CHRU de Lille, 59037 Lille Cedex.

3: Thermo Fisher Scientific (Bremen) GmbH, Hanna-Kunath-Strasse 11, 28199 Bremen, Germany

4: Thermo Fisher Scientific (France), 16 Avenue du Quebec, SILIC 765, 91963 COURTABOEUF CEDEX

5 Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHRU de Lille, 59037 Lille Cedex

6: OWNIP fellow, SUNY College at Old Westbury, Old Westbury, NY.

7: Institut de pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

***Co-authors, **corresponding author.**

Abstract

Epithelial ovarian carcinogenesis may occur de novo from the surface of ovarian mesothelial epithelial cells or from cells originating from other organs. Foreign müllerian cell intrusion into the ovarian environment has been hypothesized to explain the latter scenario. MALDI mass spectrometry (MS) profiling technology was used to provide molecular insights in these questions. In this way, the molecular signatures of diseases have been established in their molecular context. MALDI MS profiling has been used on serous and endometrioid cancer biopsies to investigate cases of epithelial ovarian cancer. Next, we applied bioinformatic methods and identification strategies on LC-MS/MS analyses of extracts from digested FFPE tissues. Extractions from selected regions (serous ovarian adenocarcinoma, fallopian tube serous adenocarcinoma, endometrioid ovarian cancer, benign endometrium and benign ovarian tissues) were performed, and peptide digests were then subjected to LC-MS/MS

analyses. Comparisons of the proteins identified from benign endometrium or ovary to the three cancer types (i.e., serous ovarian adenocarcinoma, endometrioid ovarian adenocarcinoma and serous fallopian tube adenocarcinoma) gave us some new evidences of a possible correlation between the fallopian tubes and serous ovarian adenocarcinoma. We propose here a workflow consisting in the comparison of multiple tissues in the same patient case in their anatomical context. This brought us insights in the molecular similitude between tissues and to access to highly specific markers for a single patient case.

Introduction

The origin of epithelial ovarian cancers is a critical clinical issue. As of today, predisposed patients for EOC bearing a mutation on BRCA gene are surgically supported by a prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy (BSO) consisting in the complete removal of the ovary and the fallopian tubes. This causes important inconveniences in the quality of life of the patient since the total removal of the ovary induces menopauses and consequently makes those women infertile.

There are currently two hypotheses on the origin of epithelial ovarian cancers (EOCs): intrinsic or extrinsic (1, 2). Ovarian cancer may develop *de novo* from the mesothelial epithelial cells on the surface of the ovary or from cells originating in other organs (1-3) (Figure 1). If the theory of the müllerian origin of serous ovarian cancers were validated, the surgeons' decision for the ovaries removal would be lighted by the fact that the removal of the junction of the fallopian tube and the ovary would equally reduce the risk of developing serous ovarian cancers, compared to BSO. A fimbriectomy, which consists in the removal of the fallopian tube and the junction between the fimbria and the ovary, is already proposed by some surgeons (4) for predisposed patients with BRCA mutations. The theory of *de novo* apparition of EOC is supported by the expression of HOX genes, which regulates Müllerian duct differentiation, in epithelial ovarian cancer but not in normal ovarian surface epithelium (OSE). Ectopic expression of HOX genes in mouse OSE causes tumors that resemble EOC to develop. In this scenario, different HOX genes give rise to distinct EOC histological subtypes (i.e., *Hoxa9* for serous, *Hoxa10* for endometrioid, and *Hoxa11* for mucinous cancer (1)). However, several studies have reinforced the second and newer theory, and the principal types of ovarian cancer tissues have similarities to normal Müllerian-type tissues. Serous cancer tissue strongly resembles fallopian tube tissue, endometrioid tissue is similar to endometrial tissue, and mucinous tissue resembles intestinal tissue (1-3). Recent studies of the most common type of ovarian cancer, serous adenocarcinomas, have shown that 80% are associated with *in situ* cancerous lesions of the tubal epithelium called "serous tubal intraepithelial carcinoma" (STIC), which may be the source of ovarian cancer (5-12). Moreover, genomic signatures that may be associated with STICs, such as mutations in the p53 gene, have been observed (13-19). Additional studies have identified other common signatures of serous ovarian and fallopian tube cancers, indicating that some Müllerian markers, such as PAX8, are commonly found in fallopian tubes and ovarian cancers and not

in the mesothelial epithelium of the ovary. Further studies have shown that mesothelial markers such as calretinin are absent (17).

The origin of serous ovarian cancer is still under debate but evidences enlightening the molecular nature of the tissues may be provided by mass spectrometric strategies. In the early 1990s, MALDI (matrix-assisted laser/desorption ionization) mass spectrometry profiling, which consists of a direct molecular analysis of hundreds of biological compounds in tissues, was proposed (20). Since the beginning of the last decade, many institutions have invested in molecular histological screening (20-25), including in ovarian cancer samples (22, 25-31). Thus, MALDI MS molecular profiling can be seen as a new and important “molecular histology” tool. We proposed to investigate the molecular nature of serous and endometrioid cancers using the novel MALDI MS profiling technology (Figure 2A, 2B). This technology gives a comparison of the molecular profiles from different ovarian cancer tissues with the corresponding reference tissues. We examined the global molecular profiles associated with ovarian cancer progression and observed that the different types of epithelial ovarian cancers have close similitudes with other mullerian tissues. We then aimed to the identification of the potential molecular actors implied in the close relationship between EOC tissues and mullerian tissues. To do so, we performed a solvent-based extraction on previously analyzed regions of interest of different tissues and ran LC-Orbitrap MS analyses. The use of bioinformatics for the analysis of proteomics information allowed us to depict the common molecular functions for the cancerization of different organs and gave us access to their specific molecular content. (Figure 2C)

Materials and methods

Materials

Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Sigma-Aldrich and were used without further purification. Trypsin was purchased from Promega. Acetonitrile p.a. and methanol p.a. were obtained from J.T. Baker.

Samples

FFPE tissues were obtained from the CHRU de Lille pathology department. An institutional review approval (CPP Nord Ouest IV 12/10) was obtained without requiring informed consent from the patients. Contacting the patients, often many years after surgery, was considered irrelevant by the ethical committee. Our reference pathologist (O.K.) selected FFPE blocks that contained both ovarian cancer tissue and tissue from the potential Müllerian precursor. To avoid inter-patient variability, each figure in the Results section represents tissue from the same patient. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stages were determined, and the results of the histological examinations were

recorded. For the histological imaging prior to MALDI analysis, 4- μm -thick tissue sections were cut from the formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) whole-mount ovarian tissue blocks. The sections were placed on ITO-coated slides and heated for 60 min at 58 °C (29). The tissue was counterstained with hematoxylin, eosin and safranin (HES), dehydrated using graded ethanol solutions, and air-dried for histological examination by our staff pathologist. The tissues appeared heterogeneous and contained cancerous, hyperplastic, and normal regions, with stromal tissue in each region (29, 32).

Hematoxylin, eosin and safranin (HES) staining

The following procedure was used for the HES. The sections were heated for 5 minutes, stained with hematoxylin for 3 minutes, rinsed with water, bathed twice in a solution of 156 mL EtOH (95%), 44 mL H₂O and 80 μL HCl, bathed in water, bathed in a solution of 0.48 mL NH₄OH (35%) and 200 mL H₂O, washed with water for 5 minutes, bathed in ethanol (80%), colored with eosin for 10 seconds, bathed twice with ethanol (95%), bathed twice with ethanol (100%), colored with safranin (10 g/L in ethanol (100%)) for 6 minutes, and then bathed twice in ethanol (100%) and once in xylene for 1 minute (29, 33).

Tissue de-waxing.

Ovarian FFPE tissues were used for the retrospective studies. Tissue sections (6 μm) were generated using a microtome and were applied to conductive glass slides that were coated with ITO (indium tin oxide) on one side. The paraffin was removed by submersion in toluene twice for 5 min, followed by a light rehydration in ethanol baths (100%, 96%; 70% and 30%) before the slides were dried in a desiccator at room temperature (29, 33).

Antigen retrieval.

FFPE tissues have well-conserved tissue morphology and the capacity to prevent molecular degradation. Due to methylene bridge formation during conservation, trypsin digestion is often necessary to retrieve protein information. Because cross-linking continues over time in FFPE tissue blocks, protein accessibility becomes difficult over time. Enzymatic cleavage may be affected, and this may lead to poor enzymatic yields. Therefore, it is necessary to establish processes that facilitate protein access. Many such protocols exist (33, 34). These associated molecular changes of these so-called antigen retrieval (AR) processes remain poorly understood. The most reasonable hypothesis is that AR allows changes in the conformation of cross-linked proteins and thus facilitates access to sites within the proteins. Due to the variation between different protocols, systematic tests of different AR techniques are required to optimize the protocol. Several protocols were tested here. Citric acid antigen retrieval (CAAR) provides good results with prostate tissue sections (33). The CAAR protein unmasking was performed by immersing the slides in 10 mM of citric acid for 20 min at 90°C

and then drying them in a desiccator for 10 min. Prior to the enzymatic digestion, the slides were incubated in 10 mM NH_4HCO_3 twice to remove the remaining AR solution and to condition the tissue for effective enzyme activity.

Trypsin digestion and matrix digestion

Ten milliliters of a solution of 40 mM trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate was dropped onto each tissue region of interest. The slides were then incubated for 4 hours at 37°C in a customized humidity chamber (a 10 cm x 15 cm box filled with water to one quarter of the box height and placed in a 37° incubator). After trypsin digestion, 10 μl of a 10 mg/ml HCCA solution in aqueous TFA 0.1%/ACN (3:7) was dropped onto each section (35, 36).

MALDI mass spectrometry profiling methodology

The mass spectrometry profiling approach is presented in Figure 2A and 2B (22, 25). The first step sections and prepares tissue using standard methods. The main concern is preserving tissue integrity while avoiding molecular composition changes (e.g., enzymatic activation). The second and third steps are based on MALDI-MS technology. The second crucial step is the deposition of the matrix on the tissue section. The importance of the matrix for mass spectra quality is well established, and the proper matrix choice is crucial for a successful MALDI experiment. It is also important that the MALDI-MSI matrix not induce any molecular delocalization across the tissue sample. Such delocalization must not spread further than the area analyzed by one laser pulse. The third step is the tissue data acquisition. This step is dependent on the mass analyzer and involves optimizing various parameters; the acquisition step requires the automation of the analytical process. The final step consists in the process of the data via informatics tools.

Tissue profiling using MALDI

For each tissue, 50 spectra were acquired on spots homogeneously distributed over the analysis surface. The profiles were acquired using an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a smart beam laser with a 200-Hz repetition rate and controlled by FlexControl 2.5 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The mass spectra profiles were acquired in the positive reflection mode, in the 500 to 5500 Da mass range. One thousand spectra were acquired at each position using a laser frequency of 200 Hz. The images were recorded and reconstructed using FlexImaging II 2.5 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Statistical data analysis

The data set obtained using FlexImaging II 2.5 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was loaded into ClinProTools v2.5 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) to conduct principal component (PCA) and hierarchical clustering analyses. After standardization of the data, the unsupervised PCA method was selected. The PC1 and PC2 components were found to have the largest variance (33, 37).

LC MS/MS Analyses

Trypsin-digested peptides from FFPE tissue after the antigen retrieval procedure were manually extracted from specific tissue regions after PCAs. Using a micropipette, specific regions were subjected to 20 successive washes with 100 μ L of a solution of 80% ACN in water. The extract solution was then submitted to dry with a SpeedVac (Savent). The dried peptides were then re-dissolved in 10 μ L of 0.1% TFA. Salts were removed from the solutions, and peptides were concentrated using a solid-phase extraction procedure with the Millipore ZipTip device with a final 10 μ L 80% ACN elution solution. The solution was then dried again using the SpeedVac. Dried samples were resuspended in water / 5% acetonitrile / 0.1% formic acid. Samples were separated by online reversed-phase chromatography using a Thermo Scientific Proxeon Easy-nLC system equipped with a Proxeon trap column (100 μ m ID x 2 cm, Thermo Scientific) and a C18 packed-tip column (100 μ m ID x 15 cm, Nikkyo Technos Co. Ltd). Peptides were separated using an increasing amount of acetonitrile (5%-40% over 110 minutes) at a flow rate of 300 nL/min. The LC eluent was electrosprayed directly from the analytical column and a voltage of 1.7 kV was applied via the liquid junction of the nanospray source. The chromatography system was coupled to a Thermo Scientific Orbitrap Elite mass spectrometer. The mass spectrometer was programmed to acquire in a data-dependent mode. The survey scans were acquired in the Orbitrap mass analyzer operated at 120,000 (FWHM) resolving power. A mass range of 400 to 2000 m/z and a target of 1E6 ions were used for the survey scans. Precursors observed with an intensity over 500 counts were selected “on the fly” for ion trap collision-induced dissociation (CID) fragmentation with an isolation window of 2 amu and a normalized collision energy of 35%. A target of 5000 ions and a maximum injection time of 200 ms were used for CID MS2 spectra. The method was set to analyze the 20 most intense ions from the survey scan and a dynamic exclusion was enabled for 20 s.

Analysis

Tandem mass spectra were processed with Thermo Scientific Proteome Discoverer software version 1.3. Resultant spectra were searched against the Swiss-Prot® Human database (version January 2012) using the SEQUEST® algorithm. The search was performed choosing trypsin as the enzyme with two missed cleavages allowed. Precursor mass tolerance was 10 ppm, and fragment mass tolerance was 0.5 Da. N-terminal acetylation, methionine oxidation and arginine deamination were set as variable modifications. Peptide validation was

performed with the Percolator algorithm. Peptides were filtered based on a q-Value below 0.01, which corresponds to a false discovery rate (FDR) of 1%.

Only proteins with a Score over 5 were kept for analysis, which represent protein identified with 2 or more unique peptides. Relative protein expression was calculated on the basis on the protein Score which have been showed to be a good relative indicator of differential relative expression (38, 39). We compared the obtained results with an analysis using Scaffold 3 software (40). We considered the method to be quite accurate as this gave similar results when the quantitative comparison of the different tissues proteins relied on spectral counting (data not shown). Gene ontology (GO) analysis was performed with Blast2go (41). Network analysis was performed as follow: Gene name of identified protein where used as input to retrieve network from STRING (42), this network was next loaded in Cytoscape 2.8 (43) with relative expression data as Id mapper. The Reactome FI pluggin was used to select subnetwork of GO term and NCI database associated disease specific proteins.

Results and discussion

The investigation presented here is decomposed in two parts. The first one consists in the global molecular profiling of ovarian cancer for a first insight in the proteomic content of the tissues. This is presented in this first part of the results.

Molecular signature profiling of the tissues

Due to the large amount of data acquired through the MALDI MSI approach, data reduction and multivariate analyses are necessary to extract the information of interest. Among the multivariate methods available, principal component analysis (PCA) provides a proven method for automatic feature extraction (26, 33, 37). Several studies have shown that PCA is a useful data reduction method for use with MALDI MSI in disease applications (26, 33, 37, 44, 45). PCA was applied to the data from several spectral acquisitions. In this bioinformatics spectral data processing, each peak is considered to be a dimension, and each group of spectra is considered to be a multi-dimensional space. This process reduces the multi-dimensional space to two or three dimensions. The PCA approach provides access to m/z, which demonstrates differences between or within samples (Figure 2B). PCA is often combined with hierarchical clustering (HC) because HC classifies the mass spectra according to similarities between their profiles and thus highlights regions containing differing molecular content. In these ways, the different molecular content profiles can be easily compared between different tissue types. As shown in Figure 3 (supplementary data), the mass spectra observed in normal, borderline, and adenocarcinoma ovarian tissues contain a high number of peaks that seem to present some intensity differences but that could not be precisely quantified manually. The PCA analysis thus evaluates the relative intensity of all peaks and gives an insight on the differential molecular signatures. While the progression of ovarian cancer (from an intermediate to a cancerous state) is widely accepted for some types of cancers such as

endometrioid one (46), the origin of the malignant tissue (Figure1) remains controversial. Therefore, we conducted MALDI profiling analyses and then used PCA and HC to study endometrioid and serous ovarian cancer cases. The first part of the analysis has been conducted for endometrioid ovarian cancer.

The correlation between each cellular phenotype has been tracked across the m/z detected in each tissue type. One endometrioid cancer origin hypothesis posits that cells from retrograde menstruation and endometriosis reach the ovary and develop in endometrial tissue and eventually cancer (47). For each case, the ovarian biopsy was studied concurrently with its respective case-matched controls (the endometrial tissues). We focused on cases in which the endometrioid cancers were associated with endometrial lesions (Figure 4). HES staining and pathological analysis was used to study FFPE sections from different organs of the same patient. To ease the analysis and proof the tissues natures, we kept the annotations added by the pathologist on the tissue section slides.

Two patients were selected because they presented both ovarian endometrioid and endometrial cancers or hyperplastic lesions.

These sections included borderline (BL) ovarian tissue (in green) and part of an adenocarcinoma (ADK, in blue) (Figure 4), endometrial tissue (in yellow) (Figure 4), and the contralateral normal ovary tissue (in red) (Figure 4) and adenocarcinomatous or hyperplastic endometrial tissues (in purple). Adjacent sections were then subjected to the MALDI profiling procedure after Citric Acid Antigen Retrieval and trypsin digestion to demask the peptide and protein markers. Principal component analysis (PCA) was then performed for each region of interest of the sections; the data are presented in Figure 4 for two patients cases in A and B insets. Figure 4A depicts the analysis for the first patient. Borderline (green) and cancerous (blue) tissue sections were found in the carcinomatous ovary (Figure 4A1). These tissues were compared to normal endometrium (Figure 4A2), carcinomatous endometrium (Figure 4A2), and the normal contralateral ovary (Figure 3A3). In this case, it is easy to distinguish the spectral profile scatters in the regions of interest, which are circled in the same colors used to highlight the HES sections scan. The profiles have a specific order in the 2D space that is determined by the first PCs (PC1 and PC2), ranging from normal endometrial tissue to ovarian carcinoma and with intermediate profiles for endometrial carcinoma and borderline ovarian tissue (Figure 4A4). Borderline endometrium and adenocarcinomatous endometrium tissues share common ions with borderline ovary and adenocarcinomatous endometrium tissues and with borderline ovary and adenocarcinomatous ovary tissues. In this situation, the blue arrow represents a possible continuum in the differential molecular contents of the tissues through the different organs and tissue types. The figure 4B inset presents the analysis for the second endometrioid ovarian cancer case.

We found in this case normal, borderline and carcinomatous tissues in the ovarian biopsy sections (figure 4B1). In parallel, this patient presented an atypical hyperplastic zone detected near the endometrial tissue that has been considered as a region of interest (Figure 4B2). We found that PC2-PC3 dimensions indicate a slight difference in the molecular profiles of normal endometrial tissue and hyperplastic tissue (Figure 4B3). In this case, the normal

ovarian molecular profile is different from the pre-invasive and invasive profiles. In the 2D PC space, the molecular-based profiles of ovarian borderline and carcinomatous tissue are placed after the hyperplastic endometrial tissue one after the other. From these observations, we suggest that endometrial hyperplasia may be a latent state in the progression of carcinoma. With this global molecular information, we may predict that endometrial hyperplastic cell could nest in the ovarian environment and evolve in borderline then carcinomatous states.

In this study, we granted a particular regard on serous ovarian cancers since the proof of a fallopian tube tissue origin may represent the most relevant scope for further clinical application. Furthermore, serous ovarian cancers represent the most prevalent cases.

We then applied the MALDI profiling method on serous ovarian cancer tissues. The results of these analyses are presented in figure 4. The tissues regions of interest are represented in pink for the normal fallopian tube, red for normal ovary, blue for ovarian adenocarcinoma and turquoise for tubal adenocarcinoma (Figure 5). Three patient cases have been selected. For a more defined view of the molecular profiles, we added the results of the hierarchical clustering of tissues of interest.

The first patient did not present any tubal lesion. We therefore aimed for the comparison of ovarian carcinomatous regions with the normal fallopian tube tissue. The theory of tubal origin of serous ovarian tissues indeed also includes the statement that a normal cell from fallopian tube could evolve in cancer in the ovarian environment.

The first case is presented in figure 5A inset. The PCA in the first two axes (figure 5A2) showed that normal fallopian tube and normal ovary tissues presented similar molecular profiles, that were different from the normal contralateral ovarian tissue. The hierarchical clustering (HC) data showed that the fallopian tube spectra presented an intermediate profile, between ovarian cancer and the normal ovarian tissue. (figure 5A3)

The last patient presented in figure 5B inset present a fallopian tube adenocarcinoma. (figure 5B1 and 5B2). The PCA (figure 5B3) shows that ovarian cancer presents the following order of molecular profiles: normal ovary, normal fallopian tube, fallopian tube adenocarcinoma and ovarian serous adenocarcinoma. This observation is in agreement with the theory of the molecular origin of ovarian cancer. HC (figure 5B4) also confirms similitude of ovarian adenocarcinoma and with fallopian tube adenocarcinoma and normal tissues.

These analyses are easy to perform and allow a quick survey on the global molecular differential content between the tissues. Therefore, because the identification of the proteins responsible for the molecular differentiation is difficult to obtain with the MALDI TOF TOF device, we decided to perform an in-depth analysis of the molecular content of tissues of interest in the serous ovarian cancer case.

Proteomics analyses of serous ovarian cancer and tubal cancer tissues.

In order to perform the proteomics analyses, peptide extractions from selected regions (endometrioid carcinoma constituting a first patient sample, serous ovarian adenocarcinoma, fallopian tube serous adenocarcinoma, and benign ovarian tissues constituting the second patient samples) were performed, and peptide digests were then subjected to LC MS/MS analyses.

From the identified proteins, those with a score under 5 were removed for the next analyses since they were identified from the MS/MS of less than two peptides. We then evaluated the number of common peptides between tissues of interest. Each accession numbers, proteins descriptions, gene names and relative scores associated to the selected proteins are reported in the Supplementary Table 1. The Venn diagram presented in figure 6 illustrates the common identification between each cancer tissue. The obtained overlapping identifications give an insight of the molecular similarities of the tissues. First of all, it appears that the number of specific proteins in serous ovarian adenocarcinoma samples is higher than any of the other specific proteins, suggesting that many cellular processes involving many proteins may be mandatory for ovarian cancer progression. The number of proteins in the two other cancers is similar. We then observe that the number of common proteins identified between serous EOC and fallopian tube serous cancer is higher than with the endometrioid type of EOC and, the number of common proteins identified between endometrioid EOC and tubal cancer is more than 3 fold less than between serous EOC and fallopian tube serous cancer. These observations suggest that serous EOC has a molecular profile that is more similar to tubal cancer than another type of EOC. This point also supports the hypothesis of an ectopic origin of EOC. Although these informations give interesting information of the relative molecular nature of each cancer, this comparison lacks accuracy since this relied on two patients case. Then, the comparison may be partly tampered by the interpatients variability.

We then decided to focus our regards on a single patient case of ovarian serous cancer. We then compared the tissues of interest of the sections illustrated in figure 5B.

The Venn diagram in figure 7A reports the common identification of proteins in benign ovary, serous ovarian cancer and serous tubal cancer for the same patient. As illustrated, much more proteins are common between tubal cancer and serous ovarian cancer than between serous cancer and benign ovary. This may suggest that processes implied in serous related cancers (ovarian and tubal) require a large amount of molecular actors, and that a part of these are common between ovarian and tubal serous cancers.

Protein identification (id) score were compared between different tissue regions. Differential protein id between ovarian cancer and benign tissues were selected as proteins specifically implied in the cancerous processes. Some of these showed highly similar id score between ovarian cancer and fallopian tube cancer tissues. These proteins were selected as proteins possibly implied in both ovarian and tubal serous cancers process.

The molecular functions of each of these specific proteins have then been fetched with Blast2GO. We represented in Figure 7 the pie charts of their cellular localization (figure 7B),

the biological processes in which they are involved (figure 7C) and their molecular functions (figure 7D). In these representations, we can realize that the functions principally found in common between ovarian and tubal cancer have already been found in cancer afflictions. We can therefore point the major molecular functions related to molecular binding with 35% of protein binding and metabolism (Figure 7D). Regarding the cellular processes (figure 7C) the one mostly represented correspond to the well known processes associated to cancer. Processes such as growth, cell proliferation, cellular component organization, biological adhesion, response to stimulus and signaling and metabolic processes correspond to classically described functions in cancerization phenomenon. These elements give a first clue of the underlying mechanisms related to these two cancers.

All these proteins have been reported in a network representing the functional interaction between these proteins based on String database interaction probability (figure 8). In this network, the score-based up and down regulations of each of the common proteins between ovarian and tubal cancers compared to the normal ovary is represented by a colour code, the green shade representing negative score changes, and the red shade positive score changes. We thus postulated that this change in the score ranking would reflect expression changes i.e. negative score change represent down regulation (Green) and positive score change up regulation (Red). From this global network (figure 8A), sub networks can be extracted, corresponding to proteins with functions of interest or related to physiopathological events. The first observation that can be made is that there is a large predominance of down regulations, comparing to the up regulations. Framed sub-networked were represent protein associated to NCI diseases index (<http://www.cancer.gov/>) and were selected using Cytoscape implemented Reactom FI plugin. Almost all the selected proteins have already been found to be involved in neoplasms (figure 8B). A large amount of proteins have also been found in female reproductive system neoplasms (figure 8C) and especially in ovarian cancer neoplasms (figure 8D). Amongst the upregulated proteins, chaperones, cell structure proteins and proteins involved in DNA replication are found. The down-regulated proteins correspond to other types of chaperone, adhesion and structural proteins..

From these datas, molecular functions of interest were selected to construct sub-networks, represented in figure 8 (insets at the right). We decided to draw the networks of the proteins for which the function were mainly represented, namely cellular adhesion (yellow-orange inset, figure 8E). It appears that a lot of these proteins are down regulated. This corresponds to a metastatic behavior of the cancerous cells (48). Indeed, in some spatio-temporal context, an EOC cell can detach from its tissue environment to attach to a new site. During these events, the plasmic membrane of the cell loses its surface adhesion proteins for its detachment. These observations could then lighten the common mechanisms that ovarian and fallopian tube cancer tissues may process. According to the theory of the ectopic origin of ovarian cancer, a tubal cancerous cell could detach from its tumoral site and attach in the ovarian environment. Another interesting molecular function observed in this network representation is the complement activation (purple inset, figure 8F). We also found the proteins associated to this function, down regulated in the ovarian and tubal cancerous context. This is also in agreement with previous discoveries. It has indeed been found that there is a phenomenon of

immunosuppression associated to ovarian cancer (48, 49). Here, the complement activation proteins, namely the complement proteins C3, C5, C6, C7, C9, the Complement component C8 gamma and beta chains (C8B, C8G), the Complement factor H (CFH), and the Plasma protease C1 inhibitor (SERPING1) (supplementary table 3) are all down regulated in the ovarian cancer context. Assuming that EOC would really have a mullerian origin, it is not difficult to imagine that a suppression of the innate immune reaction is mandatory for the tubal cell settling in the ovary. The foreign cell could then act as a parasite undetectable in the immune ovarian environment. This mechanism would also be necessary for evolution of these same cancerous cells in the fallopian tube environment.

In addition to the inspection of the common molecular mechanism of ovarian and tubal cancers, we decided to study the specific molecular mechanisms of ovarian and tubal cancers. Two arguments explain this investigation. First, the analysis of tubal cancer proteins could give us insights in underlying events in the fallopian tube environment that could prepare the metastasis of cancerous cells in the ovarian environment. The investigation of the specific serous ovarian cancer proteins could in another way draw the mechanisms for the evolution of cancer cells in the ovarian environment. The second argument was that this inspection could bring us a list of highly specific biomarkers for each cancer. Indeed this specific workflow allows us to compare tissue types each other in their anatomical context. Each specific protein then is found in only one tissue and not in the two other ones. The confidence of this specificity is even higher because we compared gynecological tissues each other. Indeed, as of today it is still very difficult to attribute a biomarker of gynecological affliction to a specific organ, better than another.

We first accessed the gene ontology of each protein identified specifically in serous or ovarian tissue and evaluated their molecular functions. In figure 9 A, B, C and D are represented respectively the molecular functions and the cellular processes of serous ovarian cancer and the molecular functions and the cellular processes of tubal cancer. We found that between the two tissues, the represented molecular functions were not drastically different. The relative distribution of the functions is similar between the two cancers. This reveals that, although different proteins are implied in fallopian tube cancerization, the same biological mechanisms contribute to the two neoplasms.

For example, molecular binding was highly represented in the two tissues. However, some other molecular functions were added in the case ovarian cancer, such as transmembrane transport or the peptidase function. Actin modeling, proliferation, intercellular adhesion are the principally represented functions in serous cancer. Here again, the most represented function is molecular binding.

However, the close inspection of the nature of the proteins specifically identified in serous ovarian cancer (supplementary table 1) allowed us to realize that the proteins bearing the binding functions were drastically different from the proteins found in common between ovarian and tubal cancer. Indeed, we found that adhesion proteins that were overexpressed in ovarian tissue were proteins corresponding to an epithelial differentiation. For example, cell-cell adhesion proteins, cell-cell adherent junction proteins, homophylic and homotypic cell

adhesion proteins were highly represented functions in this histological context. Some proteins implied in the cellular adhesion with the extracellular matrix were also found. The second striking observation was the high content of proteins implied in cellular proliferation. Thirdly many proteins associated with actin modeling appear as an important overrepresented function among those proteins. These observations give some insights in the specific mechanisms that we could find in ovarian cancers. In fact, serous ovarian carcinogenesis seems to be ruled by highly specific mechanisms. These could consist on the acquisition of epithelial characteristics combined with a great modeling of the cells shapes, and a greater proliferation potential. Other represented proteins are implied in metabolism, HSP binding, lipid transport and catabolism, and MAPK network activation. All these events are in agreement with previous finding made in ovarian cancer research.

We also used the Reactome NCI plugin to find if the proteins were already characterized in ovarian neoplasm. The network of these proteins is presented in figure 9E (supplementary table 4). Amongst these, we found the GTPases KRas(KRAS)(50), NRas(NRAS)(51), Mitogen-activated protein kinase 1(MPK1)(52, 53), and Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2(54, 55) which are all involved in EGF receptor signaling pathway that greatly promotes ovarian cancer(56-58), resulting in cancer progression. Focal adhesion kinase 1(59) is involved in VEGF receptor pathway that promotes angiogenesis and integrin pathway and induces the Mitogen-activated protein kinase (ERK) pathway(53) and results in cancer progression. Fibronectin (FN1)(60) is the extracellular component activating the integrin pathway. The integrin pathway also induces actin polymerization for cellular remodeling.

Another protein, Metastasis-associated protein is involved in the activation of p53 pathway (61).

In supplementary table 1, are classified the proteins specifically identified in serous ovarian cancer from highest to the lowest score. In this table we can clearly distinguish that the most prevalent proteins correspond to proteins associated to cellular shape changes (62) such as cytoskeletal proteins, namely actin, beta actin like protein or microtubule-associated proteins, etc.. Proteins related to nuclear modeling constitute another group of well-represented proteins such as histone H2B, histone H3 or heterochromatin protein 1-binding protein. Epigenetic on histones have results in the repression of some genes and in cancerization events(63). In the highest scores, we also found some proteins implied in metabolism such as transketolase (64), implied in the pentose-phosphate pathway which is often used in metastatic processes(48). We also find glycolysis proteins, which is another preferred metabolic pathway (65), such as 6-phosphofructokinase and enolase. As mentioned before, proteins involved in cell-cell interactions are represented, such as zyxin(66) or desmoglein. Finally, we found a large majority of proteins implied in RNA and protein synthesis in the highest scores. Amongst these, we found heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, ribosome-binding protein, eukaryotic translation initiation factor, protein disulfide-isomerase, 60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein, regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein, etc. All these proteins have a high score in this analysis and may be considered for further regard in additional analyses and validation by other methods in large cohorts of

patients. We have been able to point the most important proteins expressed specifically in serous ovarian cancer.

We then investigated the specific biomarkers of tubal cancer. The aim of this investigation has been the evaluation of the relevance of the biomarkers from ovaries for serous ovarian cancers. Indeed, if the theory of ovarian cancer origin is validated, it would then be more appropriate to use markers of the tubal precursors in order to screen large cohorts of patients for the diagnostic of the highly prevalent serous ovarian cancer. To do so, we used the Reactome NCI pluggin to find if biomarkers initially discovery in the ovarian cancer context would be expressed in the fallopian tube tissues (figure 9F, supplementary table 4). We observed that highly scored proteins that were previously assigned to ovarian neoplasm were found in the fallopian tube tissue. This is the first clue that some biomarkers normally found in an ovarian cancer context, could actually be biomarkers of tubal cancer. Amongst these proteins, we find Fibronectin 1 (FN1), implied in the Integrin pathway for actin remodeling (60), Cell Division Control Protein 42 (CDC42) which involves cell migration(67)., the glycolysis Enzyme Gamma -Enolase (ENO2), High-Mobility Group Protein 1 (HMGB1)(68), involved for helping transcription, replication, recombination, and DNA repair, some cell-cell junction proteins such as Junction Plakoglobin (JUP) and Alpha Catenin A1, as tubal cancer is also an epithelial cancer. The Serine/threonine-protein kinase PAK 1(69), Integrin-linked protein kinase (ILK) are involved in the cytoskeleton remodeling(70).

This network is a striking evidence that the biomarkers initially found in ovarian cancer context are also biomarkers of the fallopian tube cancer. This statement is even more reinforced by the fact that the Reactome NCI Pluggin did not allowed us to find tubal cancer biomarkers in the tubal cancer environment. Ovarian and tubal cancers evidently share biological functions for each of their development. However, it clearly appears that the anatomical context gives us a more accurate sight of biomarkers of each gynecological affliction.

We finally closely investigated the biological relevance of the highest score biomarkers in the fallopian tube environment in order to highlight the gynecological markers that the Reactome NCI Plugin could have missed.

Amongst all the high score proteins found in the tubal tumoral environment, the most striking one is periostin. This protein has been reported to be present in the environment of many cancer cells types. Periostin is a component of the extracellular matrix and acts in cancer as a ligand for alpha-V/beta-3 and alpha-V/beta-5 integrins to support adhesion and migration of epithelial cells (71). This binding also promotes the recruitment of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the activation of the Akt/PKB- and FAK- mediated signaling pathways (70). Periostin-activated signaling pathways also promote cellular survival, angiogenesis, and resistance to hypoxia-induced cell death. In ovarian cancer, it has also been previously reported that it promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis (71, 72). In this particular case, we found periostin specifically expressed in the fallopian tube cancer environment and not in the ovarian cancer one. This point is of high importance in order to understand the relevance of the adapted workflow. This specific approach, relying on

tissue proteomics in an anatomical context, allowed us to determine that periostin was a tubal cancer protein that was not present in ovarian cancer. This also allows us to bring another response element to the question of ovarian cancer cellular origin. Here, we can speculate that Periostin, which is highly expressed in tubal cancer, may induce metastasis of fallopian tube cancer cells and promote their metastasis to a host tissue, which would be the ovary.

Another biomarker of the same type, Osteopontin that also promotes cell migration via the binding with the integrins, has previously been found in epithelial ovarian cancers and has been selected with five other biomarkers for the multiplexed screening of epithelial ovarian cancers (73).

To this angle, ovarian serous cancers may developed after early events of metastasis in the fallopian tube context for tubal cancer cells settling in the ovary. This theory would be in good agreement with the relative anatomical positions of fallopian tubes and the ovaries in the gynecological tracts. Fallopian tubes and the ovaries are physiologically in a close relationship. For example, during reproduction events, after ovulation, the female gamete migrates from the ovary to the endometrium through the fallopian tube. In this point of view, it is not surprising that the predilection-hosting site for a migrating tubal cancer cell settling would be the ovary.

It is now possible to link the events that we observed to be shared by fallopian tubes and ovaries and specific events of ovarian cancer. We found that the events shared between ovarian cancer and fallopian tube cancers consisted in the down-regulation of many proteins. Supposing that a serous ovarian cancer could derive from a fallopian tube cancerous cell, it seems that in both cases, this cell could need to act as a molecular phantom in its anatomical context, this resulting from an under regulation of actors of immunity in the cancerous context. Then, the adhesion of the cell to the extracellular matrix must be suppressed in order to detach for its tumoral context. This detachment would be promoted by extracellular matrix elements. In the ovarian environment, the cell proliferation greatly increases. Also, the cell may undergo great changes in order to acquire epithelial characteristics. This event is traduced by an important remodeling of the actin network of the cell and the expression of proteins mostly involved in cell-cell interactions. All these proteins, specifically found in the ovarian cancer context may represent biomarkers of the pathology. Indeed, a particular regard must be had for the membrane proteins that are in close contact with the extracellular milieu and that could easily be found in circulating fluids.

We also proved that some biomarkers of ovarian cancer are actually biomarkers of fallopian tube cancer. This discovery highlights the great relevance of the regard for the anatomical context in the biomarkers research field. At the same time, it could open new ways of investigation for the clinical screening of ovarian cancer.

Conclusion

Many questions remain regarding the origin of EOC and its mechanisms of progression. The emergence of proteomic technologies that allows the identification of potential biomarkers in body fluids and tissues allows biologists and clinicians to access to pathological analysis on the molecular scale.

We proposed here a strategy in two steps for the study of specific proteins in their histological context. The first step of the experiment consisted in the quick examination of the molecular profiles found in the tissues of different nature. The PCA calculation is based on the global comparison of multidimensional data. We applied these analyses to spectra groups, using the relative intensities of the detected peaks in tissue sections. This experiment is a quick way to give the whole molecular contents trends of histological regions of interest on a single or few biopsies sections. The PCA were applied for the comparison of tissues in the same patient case in order to avoid the inter-patient tissue variability. We speculated that the analysis of a weak number of tissues could gain confidence when the patient itself is considered as the control of the experiment. The 2D representations provided by the PCA allowed used us to classify these in a way that it could support the hypothesis of mullerian origin of endometrioid and serous cancers.

The second step of analysis consisted is the deeper investigation of the molecular actors the tissues of interest. To do so, we performed shotgun proteomics analysis of the tryptic digests analyzed on-tissue with the MALDI source. The subsequent analysis using Blast2GO and Cytoscape softwares gave us a global view of the possible biological events that could append for serous cancer apparition. If we assume that serous epithelial ovarian cancers really originate from a fallopian tube cancerous precursor, it seems that mechanisms of cell detachment from tumoral site may be involved, as a mechanism of immunosuppression for a cell that could be considered as a foreign element in a physiological context. In the ovarian context, it also seems that specific events could append. The newly settled and undifferentiated cell could differentiate in an epithelial cell line to form the epithelial cancer in the ovarian host site.

This kind of experiment can give an important insight of the histological specificity of the proteins of each pathology. Actually, we introduced a new concept consisting in giving new evidences to a clinical problematic while acceding the molecular specificity of proteic actors of pathologies. Based on the relative score values of the proteins found in different tissues, we have been able to access the relative specificity of the proteins in each tissue. We then have been able to give the first proteomics insights of the degree of similarity of tissues of serous ovarian cancer with its possibly related mullerian tissue. This comparison allowed us to draw the possible molecular mechanisms found in both the apparition of ovarian cancer and its development.

Drawing the specific mechanisms in serous epithelial ovarian cancer is only possible using this specific workflow of tissues profiling. This also has to be taken into consideration for

specific tissue biomarkers studies. The up-regulated proteins in each tissue can be selected for their specificity against two or more tissues from the same patient.

Indeed, the clinical value of a biomarker useable for a diagnostic test is its specificity for a cancer type more than another one. Here we propose a list of specific proteins of serous ovarian cancer, found in its anatomical context, and guaranteed to be absent in the normal ovarian tissue and in another type of gynecological cancer from the same patient, namely from its fallopian tube. So these proteins are specific of the cancerous pathological status and are specific of the ovary, against other gynecologic neoplasm.

This workflow is an example of the great potential of the mass spectrometric profiling method for biomarker research and for a specific clinical application. We have been able to prove the feasibility of the method while giving the first proteomics evidences of the potential müllerian origin of serous ovarian cancer while giving highly specific serous ovarian cancer biomarkers.

The scope of this kind of analysis would be the evaluation of the most appropriate biomarker research of serous ovarian cancer. If the fallopian tube is the cause of ovarian cancer, large campaign of biomarkers of fallopian tube cancer may be done. This could give an insight of the early development of this specific neoplasm and inform of the precise time when the radical fimbriectomy could be performed for at-risk or even non-suspected patients.

To definitively validate the hypothesis and the biomarkers found, it will be necessary to repeat this experiment on a large cohort of tissues and interpret the results integrated in statistical analyses. But the use of the same patient for the comparison analysis represents a strong internal control of the experiment. At this time, we can speculate that the observations made after this work could be the cornerstone of the theory of the müllerian origin of serous ovarian cancer.

To conclude, by our approach we wanted to introduce a new way of investigation for gynecological cancers biomarker research. On-tissue proteomics allowed us to determine that ovarian cancer biomarkers should actually derive from fallopian tube cancer precursors. Then, it may be relevant to compare if biomarkers found in fallopian tube cancers would have good predictive values for the screening of ovarian cancer in large cohorts of patients. This type of investigation may have a high scope for early detection of ovarian cancers.

Acknowledgements

This research was supported by a collaboration between The Fundamental and Applied Biology Mass Spectrometry laboratory (MS) and Thermofisher (Bremen, KS) and grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Éducation Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to IF), Canadian Institutes of Health Research (CIHR to MS & RD), Ministère du Développement Économique de l'Innovation et de l'Exportation (MDEIE to RD), Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS to R.D), CHRU of Lille (to CB), CNRS

for HG and Région Nord-Pas de Calais and Université de Sherbrooke (to RL). R.D. is a member of the Centre de Recherche Clinique Etienne-Le Bel (Sherbrooke, Qc, Canada).

References

1. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol.* 2008;9:1191-7.
2. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 2004;164:1511-8.
3. Bell DA, Scully RE. Early de novo ovarian carcinoma. A study of fourteen cases. *Cancer.* 1994;73:1859-64.
4. Leblanc E, Narducci F, Farre I, Peyrat JP, Taieb S, Adenis C, et al. Radical fimbriectomy: a reasonable temporary risk-reducing surgery for selected women with a germ line mutation of BRCA 1 or 2 genes? Rationale and preliminary development. *Gynecol Oncol.* 121:472-6.
5. Callahan MJ, Crum CP, Medeiros F, Kindelberger DW, Elvin JA, Garber JE, et al. Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J Clin Oncol.* 2007;25:3985-90.
6. Carcangiu ML, Radice P, Manoukian S, Spatti G, Gobbo M, Pensotti V, et al. Atypical epithelial proliferation in fallopian tubes in prophylactic salpingo-oophorectomy specimens from BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers. *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23:35-40.
7. Colgan TJ, Murphy J, Cole DE, Narod S, Rosen B. Occult carcinoma in prophylactic oophorectomy specimens: prevalence and association with BRCA germline mutation status. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:1283-9.
8. Finch A, Shaw P, Rosen B, Murphy J, Narod SA, Colgan TJ. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol.* 2006;100:58-64.
9. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:161-9.
10. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Kenemans P, Verheijen RH. Tubal ligation and risk of ovarian cancer. *Lancet.* 2001;358:844.
11. Piek JM, Verheijen RH, Kenemans P, Massuger LF, Bulten H, van Diest PJ. BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecol Oncol.* 2003;90:491.

12. Shaw PA, Rouzbahman M, Pizer ES, Pintilie M, Begley H. Candidate serous cancer precursors in fallopian tube epithelium of BRCA1/2 mutation carriers. *Mod Pathol.* 2009;22:1133-8.
13. Staebler A. [Preneoplasias of ovarian carcinoma : Biological and clinical aspects of different pathways of tumorigenesis.]. *Pathologe.* 2011.
14. Leonhardt K, Einkenkel J, Sohr S, Engeland K, Horn LC. p53 Signature and Serous Tubal In-situ Carcinoma in Cases of Primary Tubal and Peritoneal Carcinomas and Serous Borderline Tumors of the Ovary. *Int J Gynecol Pathol.*30:417-24.
15. Chen EY, Mehra K, Mehrad M, Ning G, Miron A, Mutter GL, et al. Secretory cell outgrowth, PAX2 and serous carcinogenesis in the Fallopian tube. *J Pathol.*222:110-6.
16. Carlson JW, Jarboe EA, Kindelberger D, Nucci MR, Hirsch MS, Crum CP. Serous tubal intraepithelial carcinoma: diagnostic reproducibility and its implications. *Int J Gynecol Pathol.* 2010;29:310-4.
17. Wei CF, Hwang SH, Ho CM, Shih BY, Chien TY. Malignant mixed mullerian tumors of the ovary. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 2000;63:344-8.
18. Roh MH, Kindelberger D, Crum CP. Serous tubal intraepithelial carcinoma and the dominant ovarian mass: clues to serous tumor origin? *Am J Surg Pathol.* 2009;33:376-83.
19. Jarboe E, Folkins A, Nucci MR, Kindelberger D, Drapkin R, Miron A, et al. Serous carcinogenesis in the fallopian tube: a descriptive classification. *Int J Gynecol Pathol.* 2008;27:1-9.
20. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med.* 2001;7:493-6.
21. Callesen AK, Vach W, Jorgensen PE, Cold S, Mogensen O, Kruse TA, et al. Reproducibility of mass spectrometry based protein profiles for diagnosis of breast cancer across clinical studies: a systematic review. *J Proteome Res.* 2008;7:1395-402.
22. Franck J, Arafah K, Elayed M, Bonnel D, Vergara D, Jacquet A, et al. MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8:2023-33.
23. Schwartz SA, Weil RJ, Thompson RC, Shyr Y, Moore JH, Toms SA, et al. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Cancer Res.* 2005;65:7674-81.
24. Fournier I, Day R, Salzet M. Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003;24:9-14.

25. Fournier I, Wisztorski M, Salzet M. Tissue imaging using MALDI-MS: a new frontier of histopathology proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2008;5:413-24.
26. El Ayed M, Bonnel D, Longuespee R, Castelier C, Franck J, Vergara D, et al. MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Med Sci Monit*. 2010;16:BR233-45.
27. Franck J, Longuespee R, Wisztorski M, Van Remoortere A, Van Zeijl R, Deelder A, et al. MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. *Med Sci Monit*. 2010;16:BR293-9.
28. Lemaire R, Lucot, J.P., Collinet, P., Vinatier, D., Tabet, J.C., Salzet, M., Fournier, I. New developments in direct analyses by MALDI mass spectrometry for study ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4:S305-S8.
29. Lemaire R, Menguellet SA, Stauber J, Marchaudon V, Lucot JP, Collinet P, et al. Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *J Proteome Res*. 2007;6:4127-34.
30. Longuespée RB, C.;Castellier, C.; Jacquet, E.; Desmons, A.;Kerdraon, O.;Vinatier, D., Day, R., Fournier, I.; Salzet, M. The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg Alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling
. *Histochem Cell Biol*. 2012;in press:D.O.I. 10.1007/s00418-012-0953-0.
31. Stauber J, Lemaire, R., Wisztorski, M., Ait-Menguellet, S., Lucot, J.P., Vinatier, D., Desmons, A., Deschamps, M., Proess, G., Rudolf, I., Salzet, M., Fournier, I. . New developments in MALDI imaging mass spectrometry for pathological proteomic studies; Introduction to a novel concept, the specific MALDI imaging. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:S247-S9.
32. Bonnel D, Legouffe R, Willand N, Baulard A, Hamm G, Deprez B, et al. MALDI imaging techniques dedicated to drug-distribution studies. *Bioanalysis*.3:1399-406.
33. Bonnel D, Longuespee R, Franck J, Roudbaraki M, Gosset P, Day R, et al. Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401:149-65.
34. Gustafsson JO, Oehler MK, McColl SR, Hoffmann P. Citric acid antigen retrieval (CAAR) for tryptic peptide imaging directly on archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Proteome Res*.9:4315-28.

35. Franck J, Arafah K, Barnes A, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I. Improving tissue preparation for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. Part 1: using microspotting. *Anal Chem.* 2009;81:8193-202.
36. Lemaire R, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I. Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Proteome Res.* 2007;6:1295-305.
37. Deininger SO, Ebert MP, Futterer A, Gerhard M, Rocken C. MALDI Imaging Combined with Hierarchical Clustering as a New Tool for the Interpretation of Complex Human Cancers. *J Proteome Res.* 2008.
38. Colinge J, Chiappe D, Lagache S, Moniatte M, Bougueleret L. Differential proteomics via probabilistic peptide identification scores. *Anal Chem.* 2005;77:596-606.
39. Nanduri B, Lawrence ML, Vanguri S, Pechan T, Burgess SC. Proteomic analysis using an unfinished bacterial genome: the effects of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on *Mannheimia haemolytica* virulence factor expression. *Proteomics.* 2005;5:4852-63.
40. Searle BC. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics.* 2010;10:1265-9.
41. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics.* 2005;21:3674-6.
42. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguetz P, et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:D561-8.
43. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics.* 2011;27:431-2.
44. Djidja MC, Carolan V, Loadman PM, Clench MR. Method development for protein profiling in biological tissues by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22:1615-8.
45. Trim PJ, Henson CM, Avery JL, McEwen A, Snel MF, Claude E, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-ion mobility separation-mass spectrometry imaging of vinblastine in whole body tissue sections. *Anal Chem.* 2008;80:8628-34.
46. Kuo KT, Guan B, Feng Y, Mao TL, Chen X, Jinawath N, et al. Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. *Cancer Res.* 2009;69:4036-42.
47. Veras E, Mao TL, Ayhan A, Ueda S, Lai H, Hayran M, et al. Cystic and adenofibromatous clear cell carcinomas of the ovary: distinctive tumors that differ in their

pathogenesis and behavior: a clinicopathologic analysis of 122 cases. *Am J Surg Pathol.* 2009;33:844-53.

48. Longuespee R, Boyon C, Desmons A, Vinatier D, Leblanc E, Farre I, et al. Ovarian cancer molecular pathology. *Cancer Metastasis Rev.*

49. Longuespee R, Boyon C, Castellier C, Jacquet A, Desmons A, Kerdraon O, et al. The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling. *Histochem Cell Biol.*138:141-54.

50. Ratner ES, Keane FK, Lindner R, Tassi RA, Paranjape T, Glasgow M, et al. A KRAS variant is a biomarker of poor outcome, platinum chemotherapy resistance and a potential target for therapy in ovarian cancer. *Oncogene.*

51. Meunier L, Puiffe ML, Le Page C, Filali-Mouhim A, Chevrette M, Tonin PN, et al. Effect of ovarian cancer ascites on cell migration and gene expression in an epithelial ovarian cancer in vitro model. *Transl Oncol.*3:230-8.

52. Nonaka M, Itamochi H, Kawaguchi W, Kudoh A, Sato S, Uegaki K, et al. Activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway overcomes Cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer.*22:922-9.

53. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007;26:3291-310.

54. Wilken JA, Badri T, Cross S, Raji R, Santin AD, Schwartz P, et al. EGFR/HER-targeted therapeutics in ovarian cancer. *Future Med Chem.*4:447-69.

55. Felip E, Del Campo JM, Rubio D, Vidal MT, Colomer R, Bermejo B. Overexpression of c-erbB-2 in epithelial ovarian cancer. Prognostic value and relationship with response to chemotherapy. *Cancer.* 1995;75:2147-52.

56. Zhou C, Qiu L, Sun Y, Healey S, Wanebo H, Kouttab N, et al. Inhibition of EGFR/PI3K/AKT cell survival pathway promotes TSA's effect on cell death and migration in human ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* 2006;29:269-78.

57. Kandala PK, Wright SE, Srivastava SK. Blocking epidermal growth factor receptor activation by 3,3'-diindolylmethane suppresses ovarian tumor growth in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.*341:24-32.

58. Sheng Q, Liu J. The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.*104:1241-5.

59. Judson PL, He X, Cance WG, Van Le L. Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer.* 1999;86:1551-6.

60. Xing H, Weng D, Chen G, Tao W, Zhu T, Yang X, et al. Activation of fibronectin/PI-3K/Akt2 leads to chemoresistance to docetaxel by regulating survivin protein expression in ovarian and breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2008;261:108-19.
61. Li DQ, Divijendra Natha Reddy S, Pakala SB, Wu X, Zhang Y, Rayala SK, et al. MTA1 coregulator regulates p53 stability and function. *J Biol Chem.* 2009;284:34545-52.
62. Creekmore AL, Silkworth WT, Cimini D, Jensen RV, Roberts PC, Schmelz EM. Changes in gene expression and cellular architecture in an ovarian cancer progression model. *PLoS One.* 6:e17676.
63. Seeber LM, van Diest PJ. Epigenetics in ovarian cancer. *Methods Mol Biol.* 863:253-69.
64. Krockenberger M, Honig A, Rieger L, Coy JF, Sutterlin M, Kapp M, et al. Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17:101-6.
65. Karantanis D, Allen-Auerbach M, Czernin J. Relationship among glycolytic phenotype, grade, and histological subtype in ovarian carcinoma. *Clin Nucl Med.* 37:49-53.
66. Grunewald TG, Kammerer U, Winkler C, Schindler D, Sickmann A, Honig A, et al. Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation. *Br J Cancer.* 2007;96:296-305.
67. Myhreye K, Blobel GC. The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:8221-6.
68. Chen J, Xi B, Zhao Y, Yu Y, Zhang J, Wang C. High-mobility group protein B1 (HMGB1) is a novel biomarker for human ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 126:109-17.
69. Siu MK, Wong ES, Chan HY, Kong DS, Woo NW, Tam KF, et al. Differential expression and phosphorylation of Pak1 and Pak2 in ovarian cancer: effects on prognosis and cell invasion. *Int J Cancer.* 127:21-31.
70. Lin SW, Ke FC, Hsiao PW, Lee PP, Lee MT, Hwang JJ. Critical involvement of ILK in TGFbeta1-stimulated invasion/migration of human ovarian cancer cells is associated with urokinase plasminogen activator system. *Exp Cell Res.* 2007;313:602-13.
71. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res.* 2002;62:5358-64.
72. Zhu M, Fejzo MS, Anderson L, Dering J, Ginther C, Ramos L, et al. Periostin promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis. *Gynecol Oncol.* 119:337-44.

73. Kim K, Visintin I, Alvero AB, Mor G. Development and validation of a protein-based signature for the detection of ovarian cancer. *Clin Lab Med.* 2009;29:47-55.

Figures Legends

Figure 1: Recapitulation of the theories of the Müllerian origins of ovarian cancer types.

Neoplastic processes can originate in Müllerian-related tissues and can spread to the ovaries via post-ovulation scars or can directly evolve from benign cells. For endometrioid tissues, retrograde menstruation may have a role in disseminating cells from the endometrium to the ovaries. In serous cases, cells could come from the STICs evolving at the junctions between the fallopian tubes and the ovaries. Each tissue subtype and evolution grade is represented by a color that corresponds to the colors used for the PCA spectra spots in the following figures.

Figure 2:

A: The tissue preparation and analysis workflow for MALDI imaging. The resected organs or tissues are sliced with a microtome for FFPE tissues or with a cryostat for fresh frozen tissues. The sections are mounted on conductive slides, the matrix is dropped onto the section, and the mass spectrometric analysis is performed through the area of the tissue. The positions and intensities of the ions are represented in a visual format called “image”.

B: The corresponding PCA of the tissue with normal and carcinomatous endometrium. The PC1/PC2, PC1/PC3, and PC2/PC3 analyses are shown, illustrating the best 2D-space separation of the ions.

C: After PCA analysis, the tryptic digests are extracted for the tissue sections by solvents washes. These are submitted to proteomic analyses. The use of specific softwares allows us to access to the description of the molecular functions of the proteins and their biological process. It is also possible to elaborate the interaction networks of proteins of interest.

Figure 3 :

The mass spectra obtained from normal, borderline, adenocarcinomatous ovarian tissues and normal endometrium after antigen retrieval and tissue trypsin digestion.

Figure 4 : PCA analysis of two patients' tissues with endometrioid ovarian cancer. CAAR have been applied on FFPE tissue sections. 10 μ L trypsin droplets have then been deposited on each tissue region of interest (ROI) and HCCA matrix. 50 MALDI/TOF spectra have then been acquired for each region of interest and the obtained data were submitted to PCA for the molecular-based comparison.

A: First patient case, HES sections (1, 2, 3) and PCA analyses of normal, adenocarcinomatous ovarian tissues and normal and adenocarcinomatous endometrial tissues

B: Second patient case, HES sections (1, 2) and PCA analyses of normal, borderline and adenocarcinomatous ovarian tissues and normal and hyperplastic endometrial tissues

Figure 5 : PCA analysis of two patients tissues with serous ovarian cancer. CAAR have been applied on FFPE tissue sections. 10 μ L trypsin droplets have then been deposited on each tissue region of interest (ROI) and HCCA matrix. 50 MALDI/TOF spectra have then been acquired for each region of interest and the obtained data were submitted to PCA for the molecular-based comparison.

A: First patient case, HES sections (1), PCA analyses of normal, and adenocarcinomatous ovarian tissues and normal tubal tissue (2), HC of spectra (3)

B: Second patient case, HES sections (1, 2) and PCA analyses of normal and adenocarcinomatous ovarian tissues and normal and cancerous fallopian tissue.

Figure 6: Venn diagram of specific and commune protein of ovarian, tubal and endometrioid cancer tissues. CAAR was performed followed by on-tissues digestion. After MALDI TOF and PCA analysis, the digest has next been extracted from the tissue sections by ACN washes and characterized by LC-MS/MS. Only protein with ProteinDiscover score over 5 were kept, representing proteins identified with a minimum of 2 unique peptides with a FDR of 0,1%.

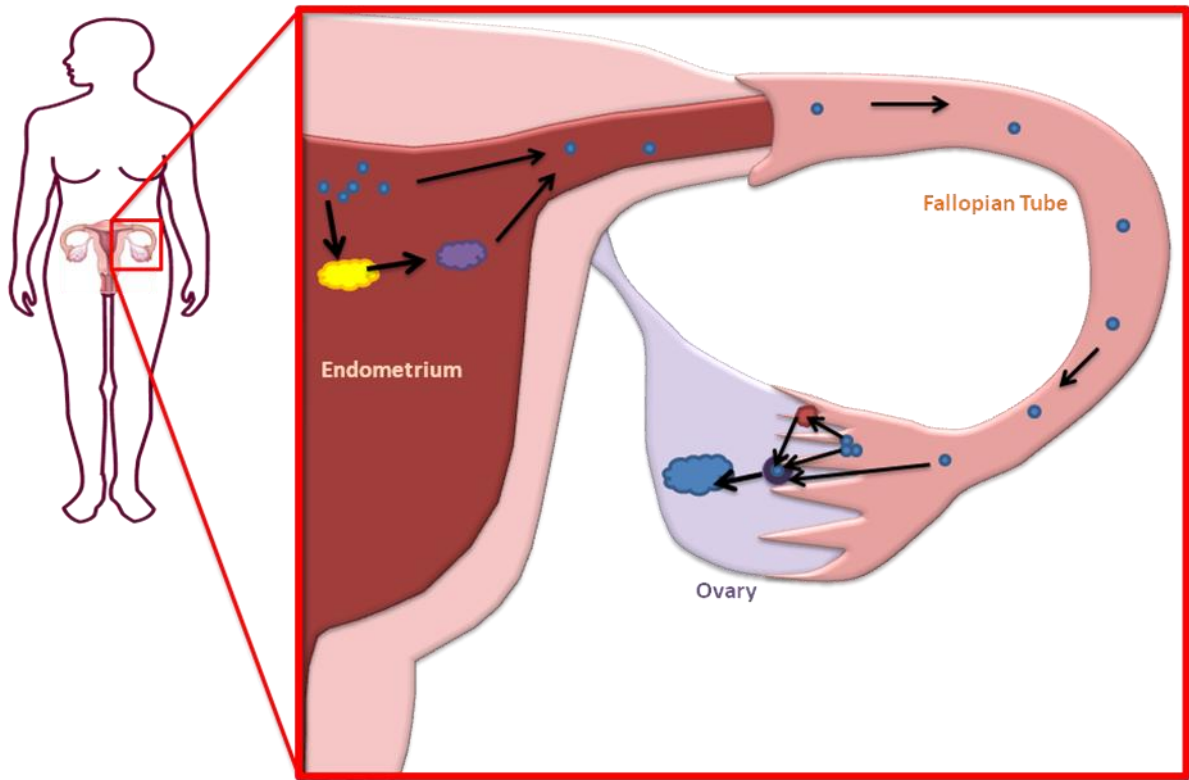
Figure 7: Analysis of common proteins identified by LC-MS/MS between serous ovarian and tubal cancers. Venn diagram of protein ids from ovarian, tubal cancer and normal ovarian tissues of the same patient case (A). Blast2Go was next used to retrieve gene ontology (GO) from highly similar id score between ovarian cancer and fallopian tube cancer tissues and pie chart for cellular localization (B), cellular processes (C) and molecular functions (D) were traced.

Figure 8: Interactions networks of commune proteins between serous ovarian and tubal cancers

Interactions were retrieved using gene name in STRING network database (A) Full network was next constructed using Cytoscape with relative expression data as Id mapper; the score-based up and down regulations of each of the common proteins between ovarian and tubal

cancers compared to the normal ovary is represented by a color code, the green shade representing negative score changes, and the red shade positive score changes. Reactome NCI pluggin have then been used to draw the subnetworks for neoplastic proteins (B), female reproductive neoplasm proteins (C) ovarian cancer proteins (D). Blast2GO molecular functions were then used to represent the networks for cell adhesion proteins (E) and innate immune system proteins (F).

Figure 9: Analysis of specific proteins from fallopian tube cancer and serous ovarian cancer. From Blast2GO annotations, piecharts representing molecular functions of ovarian cancer proteins (A) and tubal cancer proteins (B) and cellular processes of ovarian cancer proteins (C) and tubal cancer proteins (D) were traced. Using the Reactome NCI pluggin, known ovarian cancer markers networks were traced from ovarian cancer (E) and tubal cancer networks (F)



- Ovarian Adenocarcinoma Tissue ● Endometrial Borderline Tissue ● Migrating Cells
- Endometrial Adenocarcinoma Tissue ● Fallopian Tube Adenocarcinoma Tissue ● Post Ovulation Scar

Figure 1

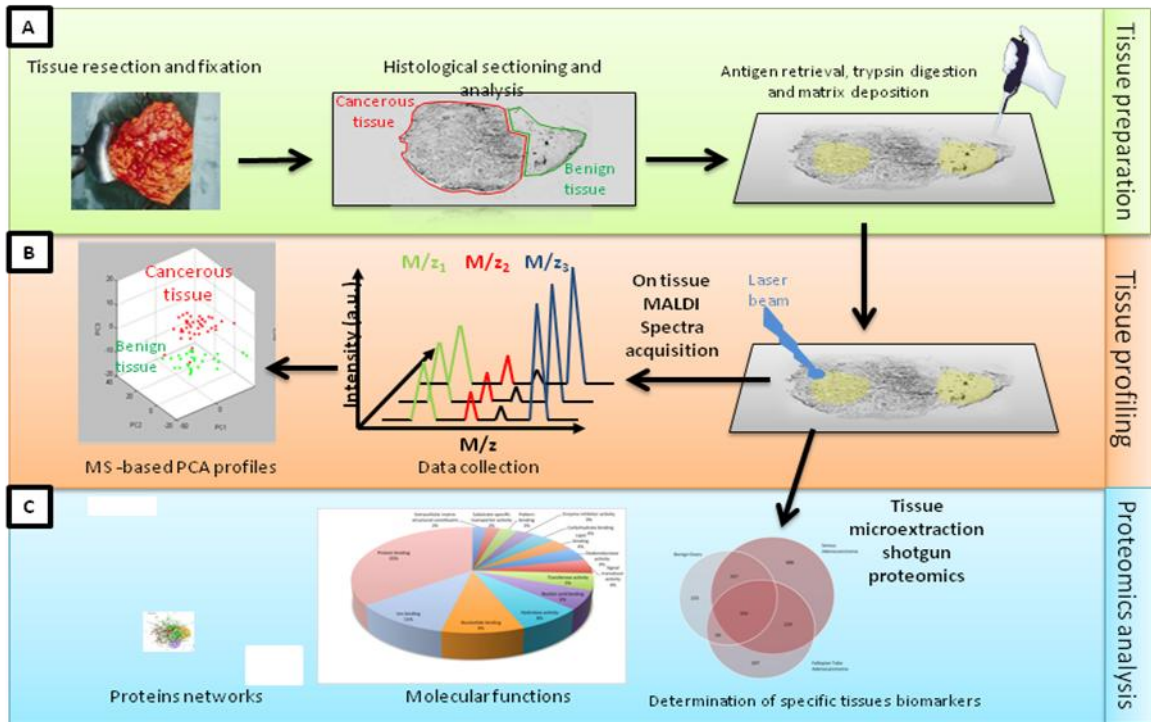


Figure 2

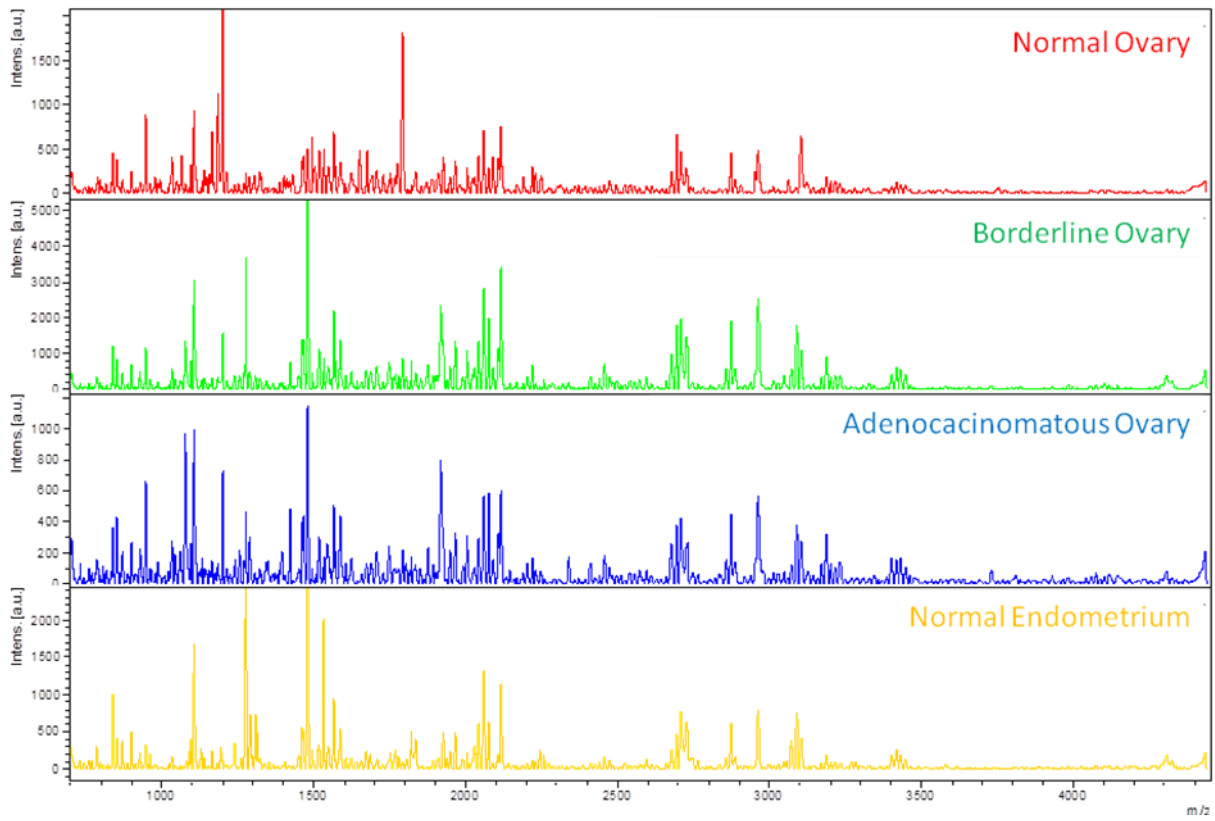


Figure 3

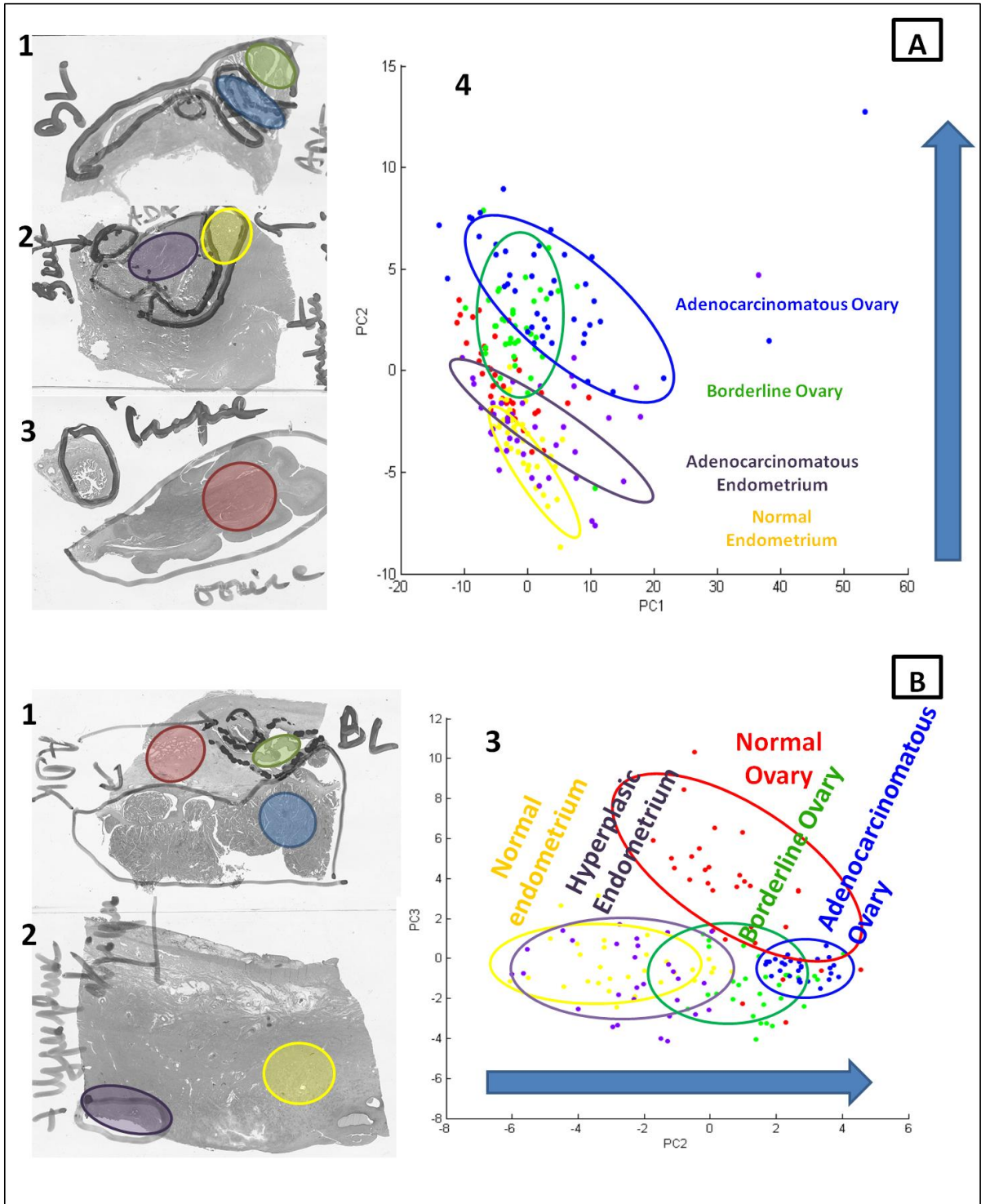


Figure 4

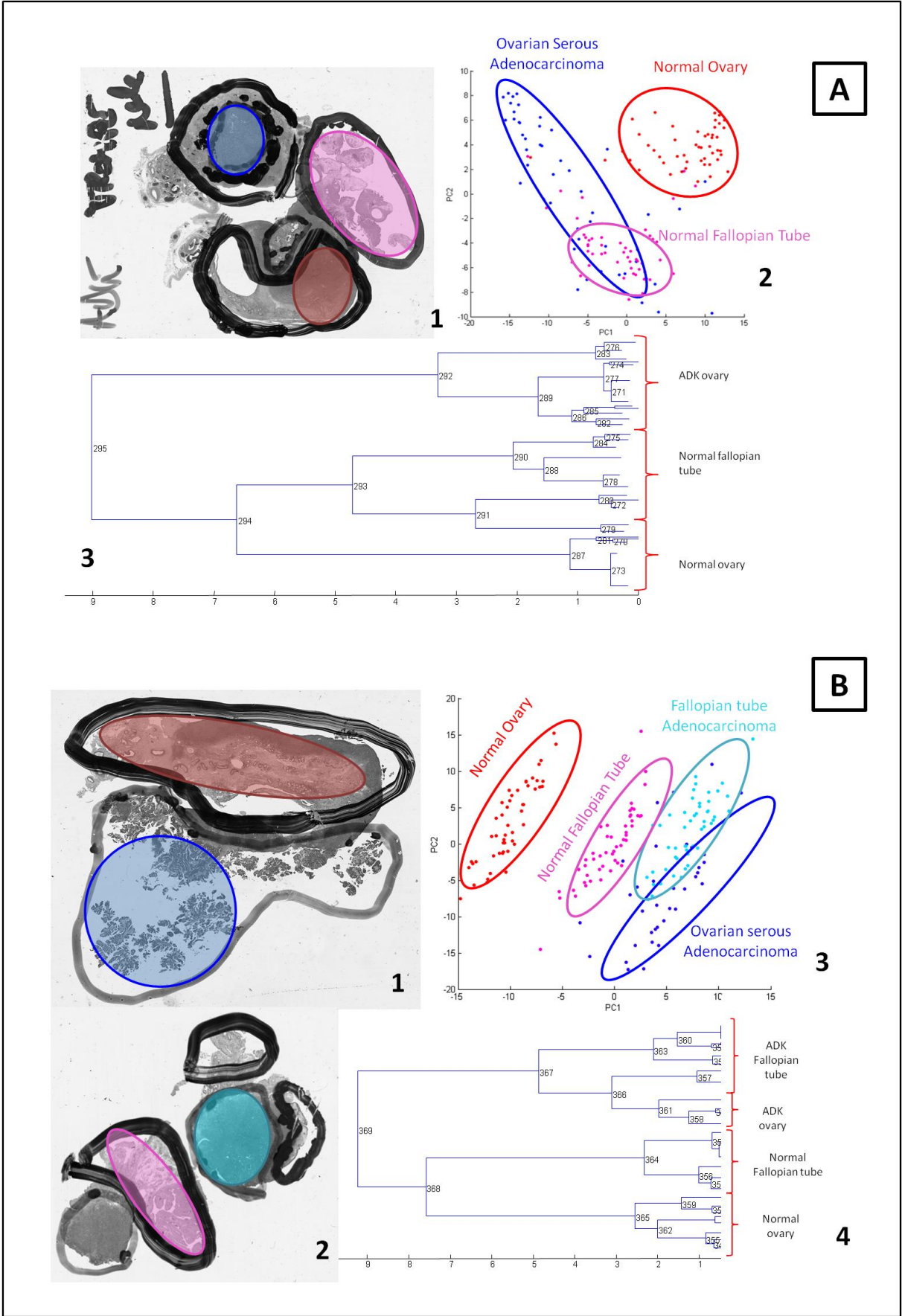


Figure 5

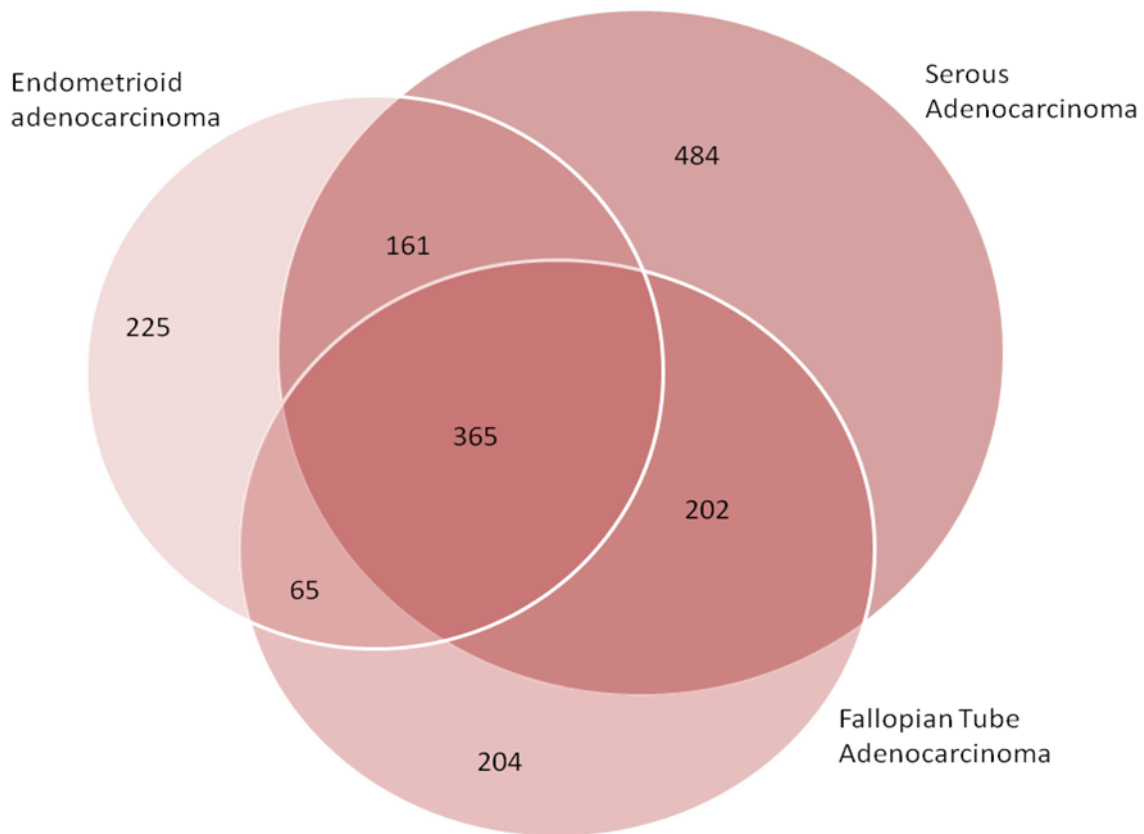


Figure 6

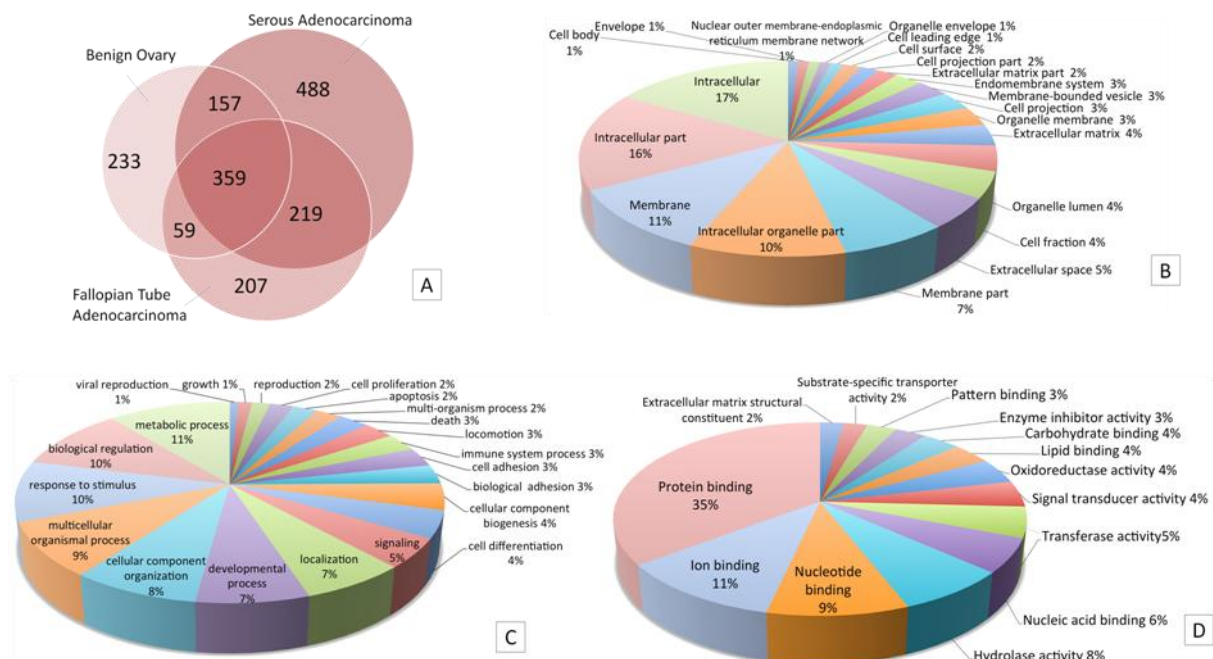


Figure 7

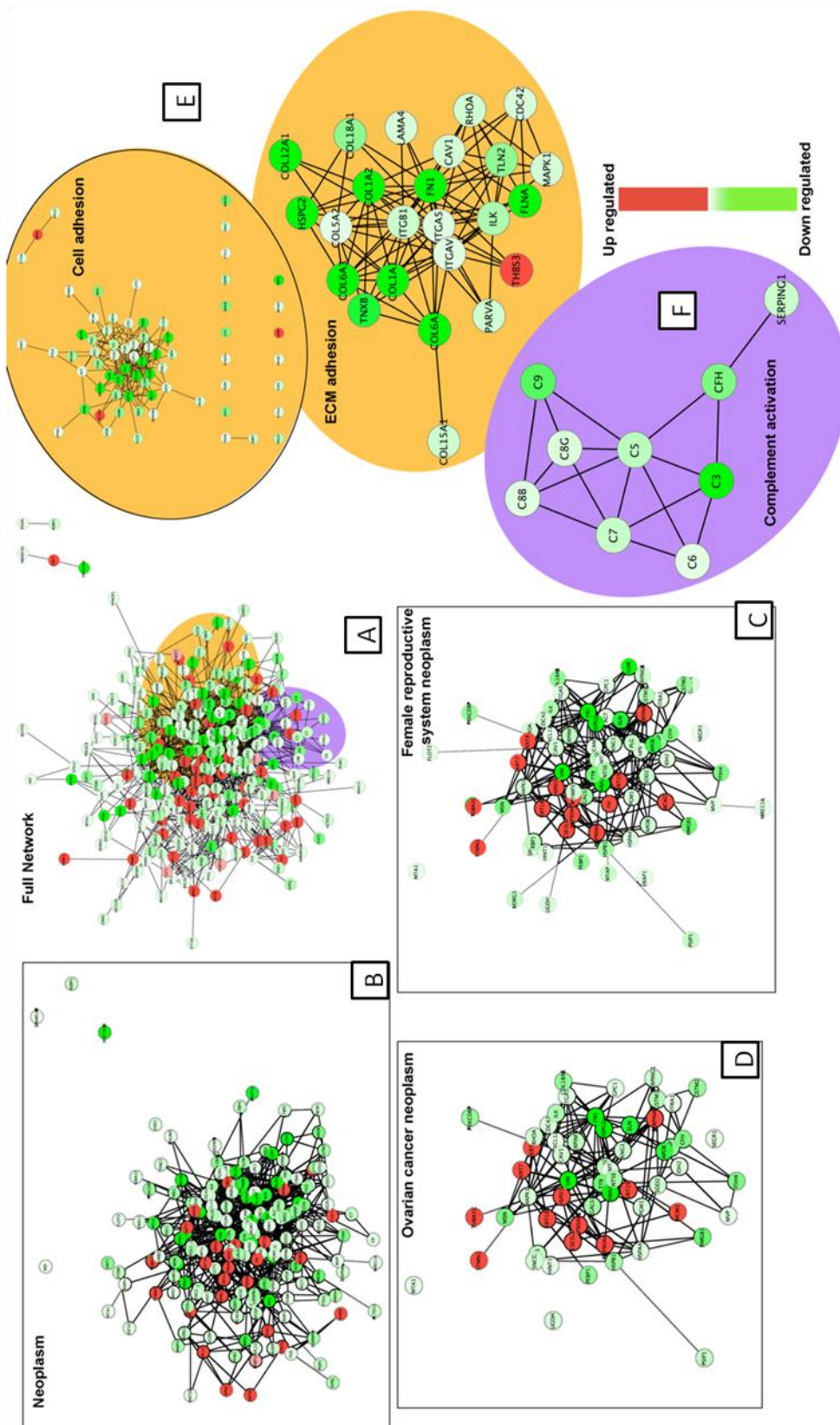


Figure 8

Article 7

Ovarian cancer molecular pathology

Rémi Longuespée & C. Boyon & Annie Desmons &
Denis Vinatier & Eric Leblanc & Isabelle Farré &
Maxence Wisztorski & Kévin Ly & François D'Anjou &
Robert Day & Isabelle Fournier & Michel Salzet

Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Ovarian cancer (OVC) is the fourth leading cause of cancer mortality among women in Europe and the United States. Its early detection is difficult due to the lack of specificity of clinical symptoms. Unfortunately, late diagnosis is a major contributor to the poor survival rates for OVC, which can be attributed to the lack of specific sets of markers. Aside from patients sharing a strong family history of ovarian and breast cancer, including the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes mutations, the most used biomarker is the Cancer-antigen 125 (CA-125). CA-125 has a sensitivity of 80 % and a specificity of 97 % in epithelial cancer (stage III or IV). However, its sensitivity is 30 % in stage I cancer, as its increase is linked to several physiological

phenomena and benign situations. CA-125 is particularly useful for at-risk population diagnosis and to assess response to treatment. It is clear that alone, CA-125 is inadequate as a biomarker for OVC diagnosis. There is an unmet need to identify additional biomarkers. Novel and more sensitive proteomic strategies such as MALDI mass spectrometry imaging studies are well suited to identify better markers for both diagnosis and prognosis. In the present review, we will focus on such proteomic strategies in regards to OVC signaling pathways, OVC development and escape from the immune response.

Keywords Ovarian cancer · Molecular pathology · Cancer antigen · MALDI imaging · Signaling pathway · Immuno-oncology

R. Longuespée · C. Boyon · A. Desmons · D. Vinatier ·
E. Leblanc · I. Farré · M. Wisztorski · I. Fournier (✉) ·
M. Salzet (✉)

Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale
et Appliquée, Université Nord de France,
EA 4550, Université de Lille 1, Cité Scientifique,
59650 Villeneuve D'Ascq, France
e-mail: Isabelle.fournier@univ-
lille1.fr e-mail: Michel.salzet@univ-
lille1.fr

C. Boyon · D. Vinatier
Hôpital Jeanne de Flandre, service de Chirurgie Gynécologique,
CHRU Lille,
59037 Lille Cedex, France

R. Longuespée · E. Leblanc · I. Farré
Cancer Center—Centre Oscar Lambret,
3 rue Frédéric Combemale, BP 307, 59020 Lille Cedex, France

K. Ly · F. D'Anjou · R. Day
Institut de pharmacologie de Sherbrooke, Université de
Sherbrooke,
Sherbrooke, GC J1H 5N4, Canada

1 Introduction

Age, genetic profile, hormonal profile (early onset of menses, high number of ovulatory cycles, late menopause, infertility, endometriosis), environmental factors (e.g., diet, obesity, smoking, virus), geographical areas, the racial and ethnic variation (correlated with the genetic inheritance) are all factors that have been implicated in OVC development ([1,2]); [3,4]; [5] Only 5–10 % of OVC is hereditary [6]. In this context, CA-125 is insufficient as a single biomarker for OVC diagnosis [7]. OVC etiology is multiple, thus, like finding a needle in a haystack, identifying and validating a single specific biomarker appears to be a very low probability event. There is an unmet medical need to aid in screening and diagnosis, and thus alternative strategies need to be considered.

2. OVC signaling pathways

Major intracellular signaling pathways are involved in OVC cell development. The understanding of the malignant mechanisms and the transformation of ovary cells to epithelial OVC are seen as a path to identify specific OVC biomarkers. The genetic studies reflect that OVC polymorphisms are highly unstable [8]. In fact, genic amplification, mutations, hypermethylations, and numerous chromosomal deletions have been found in OVC pointing the identification of several main categories of genes involved in OVC development such as tumor suppressor genes and oncogenes (Table 1) [6,9–12]. Thus, these genes are directly linked to cell signaling pathways, which play a central role in cancer cell growth, survival, invasion, and metastasis [13]. Discovering the "circuit maps" of these signaling pathways in OVC seems a good challenge for detecting novel therapeutic strategies [14–16]. According to literature, the signaling pathways associated with OVC are the followings: the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway, the activator of transcription 3 (Jak-STAT 3) pathway, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, the proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src pathway, the ErbB activation pathway, the lysophosphatidic acid (LPA) pathway, the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) pathway, the Mullerian inhibitory substance receptor pathway, the EGF and VEGF pathways and the ER beta pathway [17–40].

2.1 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells pathway

A correlation has been demonstrated between nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) activation and OVC clinical profile showing that the expression of NF- κ B p65 in OVC tumors is mainly nuclear and that their levels correlate with poor differentiation and late FIGO stage [41]. Positive patients for NF- κ B p65 subunit staining had lower cumulative survival rates and lower median survival (20 % and 24 months, respectively) than negative patients (46.2 % and 39 months, respectively). Recently, microRNA-9 (miR-9) has been shown to down-regulate the levels of NF- κ B1 [42]. Moreover, results from gene expression microarray, using the highly specific IKK β small-molecule inhibitor ML120b or IKK β siRNA to decrease IKK β expression, showed that IKK β -NF- κ B pathway controls genes associated with OVC cell proliferation, adhesion, invasion, angiogenesis, and the creation of a pro-inflammatory microenvironment. The NF- κ B family proteins are implicated in signaling pathways driving tumor development and progression by activating anti-apoptotic genes. It also activates genes involved in cell cycle progression and the secretion of tumor necrosis factor (TNF) α , interleukin (IL)-6, and growth hormones. Moreover, NF- κ B

regulates genes promoting pro-angiogenic environment through enhanced production of IL-8 and vascular endothelial growth factor and creation of a microenvironment that may prevent immune surveillance [43–45].

2.2 The mitogen-activated protein kinase pathway

Previous studies identified that mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is activated in OVC (ref). The downregulation of CL100, an endogenous dual-specificity phosphatase known to inhibit MAPK, plays a role in progression of human OVC by promoting MAPK pathway [46]. OVC epithelial cells display 10–25 times less activity of C100 compared to normal ovarian epithelial cells. The MEK inhibitor PD98059 sensitized OVC cell lines to Cisplatin. Upregulation of CL100 in ovarian cancer cells decreases adherent and non-adherent cells growth and induces phenotypic changes, including loss of filopodia and lamellipodia in association to decreased cell motility [46]. Thus, the development of specific MAPK pathway inhibitors is currently in process [47].

2.3 The ErbB activation pathway

Overexpression of c-erbB-2 protein in tumors has been reported from approximately 25 % of patients with epithelial OVC [48,49]. Multivariate analysis showed that c-erbB-2 overexpression and residual tumors, greater than 2 cm, decrease survival rates [48,49].

2.4 The Mullerian inhibitory substance receptor pathway

Anti-Müllerian hormone (AMH) is a member of the transforming growth factor β (TGF- β) family. In absence of AMH, Müllerian ducts of both sexes develop into uterus, Fallopian tubes, and the upper part of the vagina. Also, AMH exerts inhibitory effects on the differentiation and steroidogenesis of the immature ovaries, the follicle of adult ovaries and as well as fetal and postnatal Leydig cells. Other proposed targets of AMH actions include breast, prostate, ovarian, and uterine cancer cells [50].

2.5 Lysophosphatidic acid signaling pathway

Lysophosphatidic acid (LPA) is generated through hydrolysis of lysophosphatidyl choline by lysophospholipase D/autotaxin or via hydrolysis of phosphatidic acid by phospholipase A₂ or A₁. LPA is a ligand for at least four different heptahelical transmembrane G protein-coupled receptors (GPCR; LPA₁/endothelial differentiation gene (Edg)2, LPA₂/Edg4, LPA₃/Edg7, and LPA₄/GPR23/P₂Y₉) results in activation of at least three distinct G protein subfamilies (G_q, G_i, G_{12/13}) and initiation of multiple signaling pathways, including Ras/

Raf/mitogen-activated protein kinase, phosphoinositide-3-kinase/Akt, phospholipase C/protein kinase C, or RhoA small GTPase signaling [51]. Activation of these G-proteins stimulates release of cell surface metalloproteases, like the ADAM family, inducing subsequently cleavage of EGF-like ligand precursors and thus EGFR (HER/erbB) family of. This transactivation process seems to involve many signaling pathways, e.g., mitogen-activated protein kinase (p38 and p44/42), protein kinase C or c-Src. LPA induces cancer cell proliferation, survival, drug resistance, invasion, opening of intercellular tight junctions and gap junction closure, cell migration, or metastasis [51].

2.6 Phosphatidylinositol 3-kinases pathway

The phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT pathway is a key component of cell survival and is implicated in OVC cell motility, adhesion, and contributes to metastatic/invasive phenotypes of various cancer cells. PI3K was also reported to be involved in cell growth and transformation. Its effect is related to indirect or direct deregulation of its signaling pathway and causes aberrant cell-cycle progression and transformation of normal cells into tumor cells. Due to hyperactivation of the PI3K/Akt pathway in many cancers and its role in multiple aspects of cancer progression, inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway has been investigated as a treatment for cancer [52]. A proof of concept is based on the loss of function of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II (INPP4B) from the PI3K/Akt pathway acting as a tumor suppressor. Remarkably, loss of INPP4B in ovarian cancer correlates with poor patient outcomes [52].

2.7 Estrogen receptors pathway

The mitogenic action of estrogen seems to be critical to the etiology and progression of human gynecologic cancers [53,54]. Estrogens influence the growth, differentiation, and function of reproductive tissues by interacting with their receptors to mediate various signaling pathways associated with the risk of ovarian cancer [53,54]. Estrogen receptors

exist in two forms, estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) which is the predominant estrogen receptor in the ovaries [26]. Recent in vivo and in vitro studies suggest that ER β is involved with the control of cellular proliferation, motility and apoptosis in ovarian cancer; and loss of ER β expression is associated with tumor progression [55,56].

Taken together, the above studies reveal that all these signaling pathways are implicated in OVC cell differentiation, cell movement and apoptosis, and are directly linked to OVC tumor suppressor genes and oncogenes (Table 1). At this moment, it is relevant to establish a link between these signaling pathways and proteins specific to OVC cells previously identified by classical proteomic studies or mass spectrometry imaging (MSI).

3 Proteomic studies

Since the last decade, proteomic studies have been widely used to identify key proteins implicated in different ovarian cancer processes. Using these new technologies, many authors identified panels of biomarkers and tested these for their relevant utility to screen early stages of the disease. Candidate biomarkers have been detected in serum or tissues using SELDI chips analysis. From this method, a biomarker, the alpha chain of haptoglobin, has been identified and found in higher levels in samples from OVC patient [57]. Then, a protein pattern has been determined by Yu et al. [58] with 96.7 % specificity, 96.7 % sensitivity, and a predictive positive value of 96.7 %. Another group reported the use of the following markers: transthyretin, beta-hemoglobin, apolipoprotein A1, and when used in combination with CA 125, has been found to have a ROC of 0,959 for the detection of ovarian cancer, when CA 125 used alone 0.613 [59]. Two separate classical proteomic studies in 2006 [60] and 2008 [61], using liquid chromatography (LC) separation followed by MS (LC-MS), have shown that early and late stage endometrioid ovarian carcinoma MS profiles can be distinguished using a clustering analysis, which separates profiles based on feature similarity; in

Table 1 The genetic polymorphism of the OVC

Gene classification	Tumors suppressors	Oncogenes
	ARHI, RASSF1A, DLEC1, SPARC, DAB2, PLAGL1, RPS6KA2, PTEN, OPCML, BRCA2, ARL11, WWOX, TP53, DPH1, BRCA1, PEG3	RAB25, EVI1, EIF5A2, PRKCI, PIK3CA, MYK, EGFR, NOTCH3, KRAS, ERBB2, PIK3R1, CCNE1, AKT2, AURKA
Gene modulation	Amplification	Hypermethylation
Activation	RAB25, PRKCI, EVI1 and PIK3CA, FGF1, MYC, PIK3R1 and AKT2, AURKA	Deletion
Deletion	Mutation	
	KRAS, BRAF, CITNNB1, CDKN2A, APC, PIK3CA, KIT, SMAD4	IGF2, SAT2
	BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53	MUC2, PEG3, MLH1, ICAM1, PLAGL1, ARHI
		BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53, PEG3, PLAGL1, ARHI

this case, similar protein masses. These studies demonstrate that “classical” proteomics can generate molecular fingerprints of a disease. However, the disadvantage of this method is the loss of molecular discrimination of tissues subtypes regarding the anatomical context. This effect can be seen in heterogeneous carcinomas where different structural elements express specific proteome. Laser capture micro-dissection (LCM) is one of the techniques used to solve this problem/inconvenient, but this method is time consuming and based on cells phenotypes rather than the molecular content of the cells.

MALDI mass spectrometry imaging (MSI) keeps the spatial localization of the markers and discriminates cells to their molecular content. Using this technology, our group has been able to discriminate several novel biomarkers in ovarian cancer (Fig. 3 [62,63]) e.g., the C-terminal fragment of the immunoproteasome 11S, Reg alpha or mucin 9. In 2010, Hoffmann's team was able to identify 67 proteins, using this technology on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) archived ovarian tissue [64,65]. In sum, proteomic studies performed at the level of the serum, ascites, and tissues have also clearly shown the presence of protein associated the intracellular signaling pathways activation, i.e., protein associated with cell proliferation, signaling to skeleton, invasion, resistance (Table 2).

3.1 Proteins associated with cell proliferation

The protein family S100 has been previously detected in aggressive ovarian tumors [66] and more specifically, S100 A11 and S100 A12 proteins have been identified by MALDI-MSI [67]. S100 A11 has been detected in ovarian ascites [68] and this protein (or calgizzarin) is known to regulate cell growth through the inhibition of DNA synthesis [69,70]. S100 A12 is known to promote leukocyte migration in chronic inflammatory responses [71]. The expression of oviduct-specific glycoprotein (OGP, Mucin-9), a marker of normal oviductal epithelium has also been reported in conjunction with S100 proteins and cytoskeleton modifying proteins [67]. Supportive data were provided by Woo and associates who found that OGP is a tubal differentiation marker and may indicate early events in ovarian carcinogenesis. These data also support the hypothesis, recently reported, of oviduct ascini as the origin of serous ovarian carcinoma [1]. From immune components, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), induces proliferation in OVC by increasing the phosphorylation and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2, which correlates to epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation. Similarly, TGF- β produced by Treg cells stimulates tumor cell proliferation, increases matrix metalloproteinase's (MMP) production, and enhances invasiveness of OVC cells [72–76]. In OVC, IL7 has been found in ascites and plasma, and it's acting as a growth factor like in breast cancer [77–79].

Table 2 Biomarkers identified by genomic, classical proteomic, or MSI approaches

	Genomic	Proteomic	MALDI imaging
Marker name			
Mesothelin-MUC16	[192]		
STAT3	[192]		
LPAAT- β (lysophosphatidic acid acetyl transferase beta)	[193]		
Inhibin	[194]		
Kallikrein Family [9,11,13,14]	[195]		[67]
Tu M2-PK	[196]		
c-MET	[197–199]		
MMP-2, MMP-9, MT1-MPP: matrix metalloproteinase	[158,200,201]		[67]
EphA2	[202–204]		
PDEF (prostate-derived Ets factor)	[116,205]		
IL-13	[177]		
MIF (macrophage inhibiting factor)	[116,205]		
NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)	[206]		[67]
CD46	[207–209]		
RCAS 1 (Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells)	[117,210]		
Annexin 3	[211]		
Destrin	[212,213]		
Cofilin-1		[214]	
GSTO1-1		[212,213]	
IDHc		[212,213]	
FK506 binding protein		[215]	
Leptin		[216,217]	
Osteopontin		[211]	
Insulin-like growth factor-II		[218]	
Prolactin		[219]	
78 kDa glucose-regulated Protein		[220]	
Calreticulin		[220]	
Endoplasmic reticulum protein ERp29		[220]	
Endoplasmin		[220]	
Protein disulfideisomerase A3		[220]	
Actin, cytoplasmic 1		[220]	
Actin, cytoplasmic 2		[220]	
Macrophage capping protein		[220]	
Tropomyosin alpha 3 chain, alpha-4 chain		[220]	
Vimentin		[220]	[67]
Collagen alpha		[220]	

Table 2 (continued)

	Genomic	Proteomic	MALDI imaging
1(VI) chain			
Dihydrolipoyllysineresidue succinyltransferase		[220]	
component of 2-oxoglutarate Dehydrogenase			
Pyruvate dehydrogenase E1 component beta		[220]	
Superoxide dismutase [Cu-Zn]		[220]	
Chromobox protein homologue 5		[220]	
Lamin B1, B2		[220]	
14-3-3 protein		[220]	
Cathepsin B		[220]	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K		[220]	
Nucleophosmin		[220]	
Peroxiredoxin 2		[220]	
Prohibitin		[220]	
Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3		[220]	
Fibrinogen gamma Chain		[220]	
Splicing factor, arginine/serine-rich 5		[220]	
Elongation factor 1-beta		[220]	
Lysosomal protective protein		[220]	
Hemoglobin beta subunit		[220]	
Transitional endoplasmic reticulum ATPase		[220]	
Serum albumin		[220]	
Protein KIAA0586		[220]	
Similar to testis expressed sequence 13A		[220]	
SNRPF protein		[220]	
Fibrinogen gamma chain		[220]	
Transitional endoplasmic reticulum ATPase		[220]	
Heat shock 70 kDa protein 1, 60 K protein		[220]	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K		[220]	
Keratin, type I cytoskeletal 7, 9, 18, 19 ?		[220]	[67]
Adenylosuccinate Lyase		[220]	

Table 2 (continued)

	Genomic	Proteomic	MALDI imaging
Peroxiredoxin 2		[220]	
Glutathione S-transferase P		[220]	
Ras-related protein Rab-7		[220]	
Prohibitin		[220]	
Cathepsin B		[220]	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K		[220]	
Tumor protein D54		[220]	
Rho GDP dissociation inhibitor 1		[220]	
Annexin A2		[220]	
ATP synthase beta Chain		[220]	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K		[220]	
Actin, cytoplasmic 1		[220]	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B		[220]	
Immunoprotease activator fragment 11 S			[62]
Mucin-9			[67]
Tetranectin			[67]
Urokinase plasminogen activator			[67]
Orosomucoid			[67]
S100-A2			[67]
S100-A11			[67]
Apolipoprotein A1			[67]
Transgelin			[67]
Prolargin			[67]
Lumican Precursor			[67]
Siderophilin			[67]
Alpha 1 antiprotease			[67]
Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein			[67]
Hemopexin			[67]
Profilin -1			[67]
HLA G			[1]
Chorionic Gonadotropin Hormone			[1]

pDcs are also present in tumor environment and stimulate tumor growth by releasing TNF- α and IL8. The sum of these data reflects that cytokines exert pleiotropic effects in OVC and exert a major role in tumor proliferation.

3.2 Signaling to the cytoskeleton

Several candidate proteins, including profilin-1, cofilin-1, vimentin, and cytokeratin 19 are involved in the intracellular

signaling to the cytoskeleton. Changes in cell phenotypes, such as the conversion of epithelial cells to mesenchymal cells, are integral, not only to embryonic development, but also to cancer invasion and metastasis. Cells undergoing epithelial–mesenchymal transition (EMT) lose their epithelial morphology, reorganize their cytoskeleton, and acquire a motile phenotype through the up- and downregulation of several molecules, including tight and adherent junction proteins and mesenchymal markers. TGF- β has been described to induce EMT in ovarian adenocarcinoma cells [80]. In the human lung adenocarcinoma cell line A549, this differentiation is followed by modification in the expression of several cytoskeleton proteins including β -actin, cofilin 1, moesin, filamin A and B, heat-shock protein beta-1, transgelin-2, S100 A11, and calpactin. Most likely, these changes increase migratory and invasive abilities [81]. Treatment of the OVC cell line SKOV-3 with TGF- β increases the expression of cofilin and profilin-1 at mRNA and protein levels and modifies its cytoskeletal organization assessed by confocal microscopy analysis [76]. After binding to its receptor, TGF- β stimulates the reorganization of the actin cytoskeleton and triggers the formation of stress fibers and cellular protrusions [82].

3.3 Hormonal pathways

Several hormones have been detected during proteomic studies like leptin, prolactin, osteopontin, insulin-like growth factor-II, anti-mullerian hormone, and HCG [83]. Leptin is produced by adipocytes and known to stimulate the growth of BG-1 ovarian cancer cells via the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. Recent studies have demonstrated the involvement of the estrogen receptor (ER) pathway in the mechanism of leptin-induced OVC growth via STAT-3 [84]. Elevated seric levels of prolactin (PRL) in ovarian and endometrial cancers have been reported, indicating a potential role for PRL in carcinogenesis [85]. Binding of PRL to its receptor was followed by rapid phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1, signal transducer and activator of transcription 3, CREB, ATF-2, and p53 and activation of 37 transcription factors in ovarian and endometrial carcinoma cells. Osteopontin (OPN) is known to increase the survival of OVC under stress conditions in vitro and promotes the late progression of ovarian cancer in vivo. The survival-promoting functions of OPN are mediated through Akt activation and the induction of HIF-1 α expression [86]. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) is also overexpressed in ovarian malignant tissues and in the serum and cystic fluid of ovarian cancer patients, suggesting its important role in the biology of ovarian cancer by increasing invasion capability of ovarian cancer cells [87]. HCG is a glycoprotein

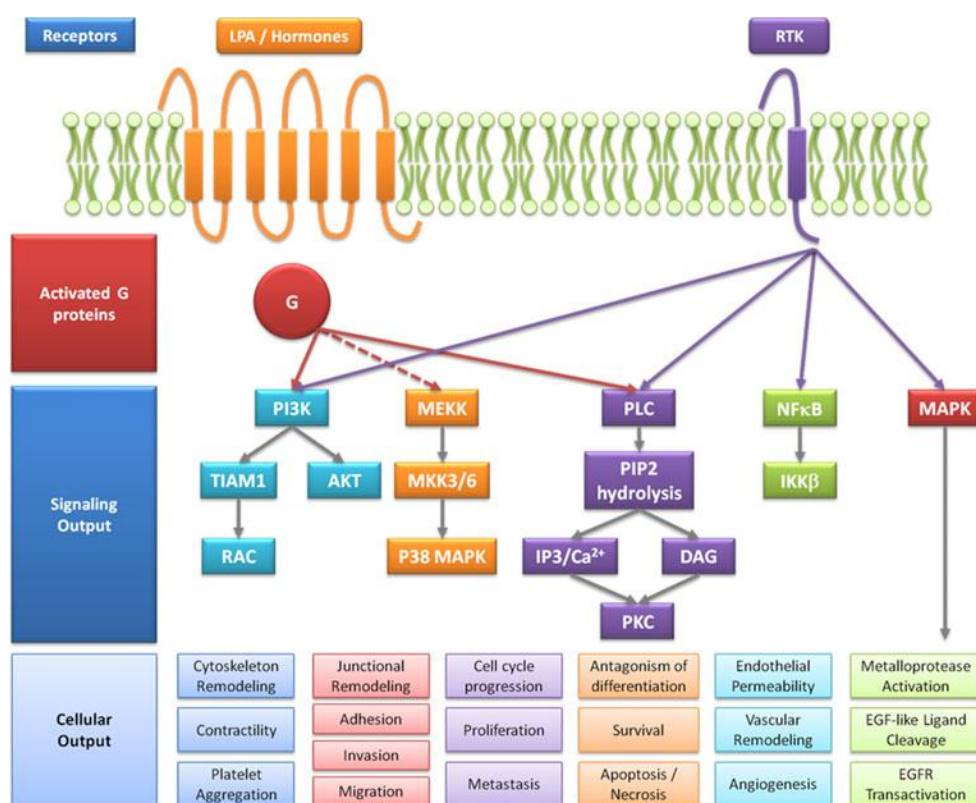
consisting of subunits alpha and beta, which are non covalently linked. The hormone is normally produced by the syncytiotrophoblastic cells of the placenta and is elevated during pregnancy. Recently, beta-hCG and alpha-fetoprotein have been detected in OVC germ cell tumors [88,89]. These proteins have been detected at early stages of the cancer, as well as lysophosphatidic acid, mesothelin, HE4, osteopontin, VEGF, IL-8, M-CSF, different kallikreins [90–92], and the C-terminal fragment of the 11S immunoproteasome (Reg-alpha) [1,67].

Most of the above proteins are directly linked to signaling pathways for cytoskeleton remodeling, contractility, junction remodeling, adhesion, invasion, migration, cell cycle progression, proliferation, metastasis, apoptosis/necrosis, angiogenesis, endothelial permeability, vascular remodeling, metalloprotease activation, and EGFR transactivation (Fig. 1). The immune response modulation is another dysregulated cell signaling pathway found in OVC. In fact, cancer cells use various strategies to escape from the immune response. In this context, it is interesting to link activated intracellular signaling pathways to the proteins involved in immune response escape.

3.4 Proteins involved in immune response modulation

Several hepatic and acute phase proteins (haptoglobin- α , bikunin, C-reactive protein), cytokines and growth factors (vascular endothelial growth factor—VEGF, insulin-like growth factor II—ILGF II, IL-6, IL-10, macrophage-colony stimulating factor—M-CSF, osteopontin, macrophage inhibitory factor) have been detected in OVC. However, recent studies have shown that ovarian cancer-associated ascites may provide an immunosuppressive environment [77]. A high CD4/CD8 ratio, which may indicate the presence of regulatory T cells, is associated with poor outcomes. Recently, Clarke et al. [93] have validated in a cohort of 500 ovarian cancer patients that the presence of intraepithelial CD8+ T cells correlates with improved clinical outcomes for all stages of the diseases. Curiel et al. [94] demonstrated in 104 ovarian cancer patients that CD4+ CD25+ FoxP3+ Tregs suppress tumor-specific T cell immunity and contributes to growth of the tumor in vivo. These data suggest a mechanism of immune suppression in ovarian cancer either through overexpression of Tregs or by the capability of tumors to escape from the immune response (using molecular mimicry) or immunosurveillance [95,96]. Additional evidences have reinforced the involvement of Tregs in ovarian cancer. CCL22, a protein secreted by dendritic cells and macrophages, highly expressed in tumor ascites is known to have a role in Treg cell migration in tumors [94]. Overexpression of the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) has also been demonstrated in ovarian cancer [97–100]. IDO suppresses

Fig. 1 Ovarian cancer intracellular signaling pathways scheme. LPA/hormones bind to RPCG receptors. Cytokines/growth factors bind RTK receptors. Intracellular pathways and signaling out are detailed. Cellular output after signaling pathways activation are presented



the proliferation of effector T cells or natural killer cells and their killer functions [98,101]. In ovarian cancer, high IDO expression in tumor cells was correlated with a reduced number of tumor-infiltrating lymphocytes [97]. Reduced IL-2 combined to elevated TGF-β and IL-10 levels favor induced Tregs [102]. On the other hand, tumor cells escape the immune response by inducing peripheral mature DCs to induce IL-10 CCR7+CD45RO+CD8+Tregs. Primary suppressive CCR7+CD45RO+CD8+ T cells are found in the tumor environment of patients with ovarian cancer [103]. Another way that tumor cells escape immunosurveillance is through the expression of human leukocyte antigen (HLA-G) ([104–106]{Sheu, 2007 #5782). Recent studies have shown that the expression of HLA-G was detected in 22/33 (66.7 %) primary tumor tissues but was absent in normal ovarian tissues (P<0.01). Cytotoxicity studies showed that HLA-G expression dramatically inhibits cell lyses by NK-92 cells (P<0.01), which could be restored by the anti-HLA-G conformational mAb 87 G (P<0.01). HLGA-G5 type has been detected in tumor while soluble form of HLA-G was found in ascites [107,108] and in the blood of patients [109]. HLA-G seems to be implicated in the immune response modulation through NKT cell inhibition [110]. In the tumor cells expressing a B7 co-stimulatory family molecule, B7H4 is known to inhibit antigen-dependent induction of T cell proliferation and activation. B7-H4 promotes the malignant transformation of epithelial cells by protecting them from apoptosis and seems to be expressed at an early stage of tumor

development [111–113]. In the same way, tumor cells highly express the mesothelin-Mucin 16 (MUC16), which inhibits the formation of immune synapses between NK cells and ovarian tumor targets [114] (Fig. 2).

Transcriptomic and proteomic studies performed at the tumor level confirmed the active role of the tumor cells to escape from the immune response. For example, the over-expression of the macrophage migration inhibitory factor (MIF) [115,116] and the receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells [117] (known to be implicated in lymphocytes apoptosis), were shown using transcriptomic approaches MIF contributes to the inhibition of antitumoral CD8+ T and NK cells by downregulating NKG2D levels (NK cell receptor NK group 2D). [118]. From MALDI-MSI studies, five factors involved in immune response modulation in mucinous tumors have been identified, namely a C-terminal fragment of the 11S immunoproteasome (Reg-alpha), orosomucoid, apolipoprotein A1, hemopexin, and lumican, which have also been detected in ascites [62,63,67,119,120]. Cleavage of PSME1 (proteasome activator complex subunit 1, 11S regulator complex [syn: PA28 alpha]) into the Reg-alpha fragment could lead to default self-antigen presentation [62] (Fig. 3). PA28 is a regulatory complex associated with 20S proteasome that consists of three subunits: alpha, beta, and gamma [121]. Binding of the 11S regulator complex to the 20S proteasome does not depend on ATP hydrolysis and, unlike the 19S regulatory subunit, the 11S regulator complex does not catalyze degradation of large proteins. Rather, it is

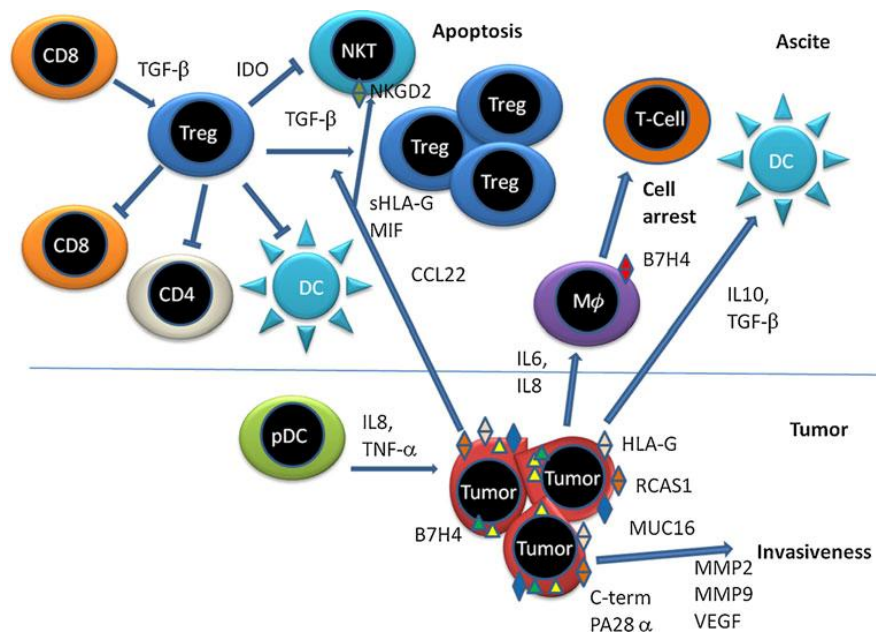


Fig. 2 Tumor cell factors production for escaping immune response. Apolipoprotein A1 has been detected in conjunction with transthyretin and transferrin in early-stage mucinous tumors. Lumican, which is a small LRR proteoglycan in the extracellular matrix is known to be overexpressed in breast cancer and to play a role in tumor progression. ApoA-I is known to decrease expression of surface molecules such as CD1a, CD80, CD86, and HLA-DR in dendritic cells, and it stimulates the production of IL-10. Hemopexin has recently been demonstrated to reduce TNF and IL-6 from macrophages during inflammation, and it limits TLR4 and TLR2 agonist-induced macrophage cytokine

production. Orosomucoid have immunosuppressive properties in ovarian carcinoma ascites through inhibition of IL-2 secretion by lymphocytes. The tumor environment expresses molecules that can convert functional APCs into dysfunctional ones. These dysfunctional APCs in turn stimulate Treg differentiation and expansion. The tumor produces IL6, IL8, MUC18, MIF, RCAS1, sHLA-G exerting negative effects on the T cells. PA28 activator belongs to the antigen processing machinery (APM). Its alteration by cleavage by (furin, PACE4) in ovarian carcinomas participates in a mechanism to evade immune recognition

responsible for MHC-class 1 antigen processing [122–124], which is greatly improved by interferon gamma-induced expression of the alpha and beta subunits [125]. Several viral proteins that interact with these proteasome subunits have been reported and may interfere with host anti-viral defenses, thereby contributing to cell transformation [126]. The manner in which they bind to the core particle (via its subunits C-terminal tails) and induce a α -ring conformational change (to open the 20S gate), suggests a mechanism similar to the 19S particle [121]. No role in ovarian cancer has been demonstrated for the 11S regulator complex. Our data demonstrate a high expression level of PA28 in carcinomas, especially in epithelial cells at stage III/IV (Fig. 3a,b), also at early stages Ia (Fig. 3c) [1] and as a marker of tumor relapse after chemotherapy (Fig. 3d). The PA28 activator belongs to the antigen processing machinery (APM). Its alteration by cleavage in ovarian carcinomas may be a mechanism to evade immune recognition. Similar hypothesis has already been proposed in the case of APM chaperones such as TAP, LMP2, LMP10, and tapasin in colon carcinoma, small cell lung carcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines. In fact, IFN- γ treatment of these carcinoma cell lines corrects the TAP, LMP, and tapasin deficiencies and enhances PA28 α ,

LMP7, calnexin and calreticulin expression, which is accompanied by increased levels of MHC class 1 antigens [127]. PSEM2 (proteasome activator complex subunit 2, PA28 beta) has also been detected in ascites fluid, implicating an immune cell tolerance toward carcinoma cells and confirms the dysregulation of self-antigen processing in ovarian tumors [68]. Additionally, PA28 alpha seems to be a target for Epstein-Barr virus (EBV) and herpes virus (HV), as our proteomic and qPCR data indicates [128,129]. Pudney et al. [130] have also shown that as EBV-infected cells move through the lytic cycle, their susceptibility to EBV-specific CD8⁺ T cell recognition falls dramatically, concomitant with a reduction in transporter associated with antigen processing (TAP) function and surface human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) class 1 expression. The implication of virus in the etiology of ovarian cancer is also sustained by the overexpression of furin enzyme [1,67], which is known to be implicated in glycoprotein B cleavage through a motif R-X-K/R-R in both EBV and HV [128,129].

Among the other four factors that might participate in the tolerance phenomenon by inhibiting immune activation, the acute phase protein orosomucoid (ORM, also known as

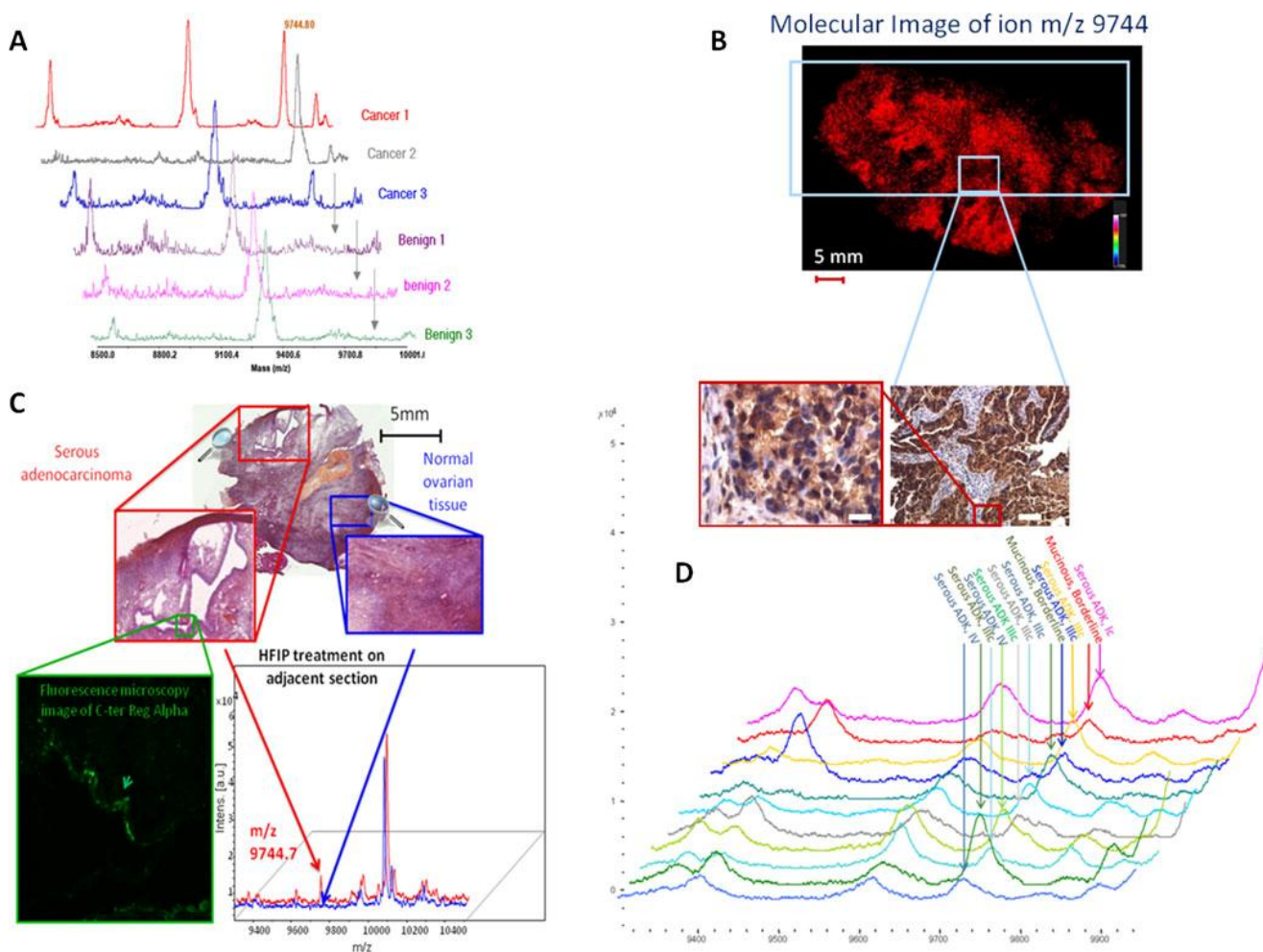


Fig. 3 Example of MALDI MSI and profiling workflow for ovarian cancer biomarker discovery and validation: a MALDI mass spectrometry profiling spectra of six patients, i.e., three suffering of adenocarcinoma and three benign tumors. The m/z at 9744 corresponds to the Cter fragment of RegAlpha. b Epithelial ovarian cancer tissue section with a benign and a cancerous parts submitted to an automatic matrix deposition using a micro spotting machine (CHIP 1000, Shimadzu). Molecular image corresponding of the m/z 9744 Cter fragment of RegAlpha in the tumoral area of the ovarian biopsy with inset pictures of immunohistochemical validation of the presence of the biomarker using an antibody designed against the Cter part of RegAlpha. c The MALDI MS spectra of tissue extract from stage 1a serous OVC biopsies. The C-terminal Reg-alpha fragment (m/z 9,744) is detected in the acini

cells. The inset shows fluorescent immunocytochemistry data using the anti-C terminal Reg alpha fragment and hematoxylin and eosin (H&E) staining of the tissue subjected to the MALDI MS profiling analyses (scale bar 5 mm) [191]. d The MALDI MS spectra of the tissue extract from the carcinoma regions of ten patients at different pathologic stages after neo- adjuvant chemotherapy. Mass spectra analyses of extracts from stages I, IIIc, and IV serous tumors after neoadjuvant chemotherapy. The ion with an m/z ratio of 9774 corresponds to the C-terminal Reg-alpha fragment, is found in each patient and is indicated by an arrow. These data confirm that the C-terminal fragment of Reg alpha can be a good marker for the early diagnosis of tumor relapse (all tissues came from patients collected after neoadjuvant chemotherapy with 6 cycles of carboplatin/Taxol followed by carboplatin with Caelyx before complete surgery) [191]

alpha1-acid glycoprotein or AGP), which is normally increased in infection, inflammation and cancer, seems to have immunosuppressive properties in ovarian carcinoma ascites through inhibition of IL-2 secretion by lymphocytes [131]. Similarly, apolipoprotein A1 has been detected in conjunction with transthyretin and transferrin in early-stage mucinous tumors [132]. ApoA-I is known to decrease expression of surface molecules such as CD1a, CD80, CD86, and HLA-DR in dendritic cells and stimulates the production of IL-10 [133] (Fig. 2). Interestingly, hemopexin has recently been demonstrated to reduce TNF α and IL-6

from macrophages during inflammation and limits TLR4 and TLR2 agonist-induced macrophage cytokine production [134]. In SKOV-3 epithelial ovarian carcinoma cells, all TLRs are overexpressed with the exception of TLR9 and TLR10 [1]. This is in line with the overexpression of lumican, which is a small LRR proteoglycan in the extracellular matrix. Along with other proteoglycans, such as decorin, biglycan, and prolargin, lumican is known to be overexpressed in breast cancer and playing a role in tumor progression [135,136]. However, as demonstrated for biglycan, which interacts with TLR2/4 on macrophages [137,138], we

speculate that lumican is also involved in the activation of the inflammasome through TLR2/4 interaction. The activation of all danger-sensing receptors in carcinoma cells can be explained through the regulation of inflammation by carcinoma cells to facilitate tumor progression. In a sense, this implies that ovarian cancer cells use molecular mimicry as “parasites” to escape the immune response, as they produce immunosuppressors to achieve tolerance [139].

4. Specific mechanisms underlying ovarian cancer metastasis

The clinical and biological behavior of epithelial ovarian cancers differs from any other type of cancers. While the dissemination of cancerous cells in other carcinomatous afflictions requires the implication of vascular mechanisms of intra- and extravasation for the migration from the primary site to distant organs, ovarian carcinoma metastasis is a more passive event. Indeed, cells coming from the ovarian tumor often migrate to peritoneal organs with the physiological movement of peritoneal fluid but rarely create metastasis outside the peritoneum. This passive clinical mechanism is supported by some molecular changes in the cell elements for its anchoring to the remote metastatic sites. The surrounding cellular and tissular environment also promotes hosting of the cells outside the ovarian tumor. The first biological mechanism for cell migration is the epithelial–mesenchymal transition (EMT) which facilitates the attachment of neoplastic cells to new tissue sites [82] (Fig. 4). Due to the lack of an anatomical barrier, ovarian carcinoma can spread directly throughout the peritoneal cavity, mainly by intra-abdominal dissemination and by lymphatic dissemination, enabling in this way the attachment to peritoneum and omentum. This event is characterized by proteins' and genes' modifications like epithelial intermediate filaments, whose expression is typically reduced, and in the overexpression of vimentin and matrix metalloproteases (MMPs). It has characterized by alterations in the expression of cell-to-cell adherents junctions and cell-matrix adhesion molecules including integrins and E-N-cadherin E-cadherin [140,141] (Fig. 4). It has recently also be validated that this event is related to an elevation of the expression of the glycoprotein MUC 4 [142]. E-cadherins allow the junction between the filaments of actin inside the cell and its cellular environment. This deficiency allows the cells to initiate its detachment from the tumor site. MUC4 is also associated to an elevation of other cadherins [143] such as N-cadherins, but also other mesenchymal markers such as Vimentin [142], which are also expressed and confer the cells an invasive phenotype. EMT confers as well the ability of cells to evolve in unfavorable conditions such as hypoxia [144]. Once the cell detached from the tumor site, the peritoneal environment of ascites starts the

promotion of ovarian carcinoma cells proliferation and implantation in peritoneal sites. Growth factors play a critical role in motility and invasiveness of these cells where VEGF is one of the principal factors [145] (Fig. 4). It acts through EGFR, which has been proven to be overexpressed in 70 % of carcinomas [146]. This process activates the MAPK pathway, which in turn contributes to the lack of cell–cell junctions. VEGF also activates the PI3K pathways, which contributes to the localization of the matrix metalloproteinase 9 at the membrane surface for the cleavage of E cadherins [147,148]. Moreover, VEGF stimulates ascite accumulation by increasing diaphragmatic and tumor associated vasculature [145,149]. Then, cancer cells can migrate through the peritoneum as single cells or groups of multiple cells called spheroid composed of multiple cells group. These spheroids present at their surface $\alpha 5\beta 1$ integrin, which play a role in these spheroid formation [150] and its ligand fibronectin, important for spheroid growth. Other couples integrin/ligand exist such as $\alpha 6\beta 1$ integrin/laminin and $\alpha 2\beta 1$ -integrin/type IV collagen, which intervenes in the attachment of the spheroids with the mesothelium of the peritoneum and the omentum [151]. In the process of cellular invasion, proteolytic enzymes are mandatory in order to release the spheroids to the peritoneal environment. Matrix metalloproteinase type I and II play this role in the primary cancerization steps [152,153]. After the transit in the peritoneum, cancerous cells succeed and attach to the peritoneum, which is constituted by mesothelial cells with collagen types I and IV, fibronectin and laminin. Coupled integrins then act for the attachment. At this step, VCAM is also a membrane protein at the surface of mesothelial cells that binds $\alpha 4\beta 1$ integrin from the cancerous cells surface [154]. With the integrins, CD44 can also be an element of binding, which attaches to hyaluronic acid [155]. Additionally, adhesion molecules such as NCAM can promote ovarian cancer metastasis via the interaction with receptors such as FGFR [156]. Proteolytic activity is a requested mechanism for cells attachment since MMP-2, at the surface of cancer cells, cleaves fibronectin and vitronectin (extracellular matrix proteins) into smaller fragments to increase adhesion, respectively, with $\alpha 5\beta 1$ $\alpha v\beta 3$ integrins [157,158]. Furthermore, host cells produce MMP9 to improve adhesion of cancerous cells [159]. Transglutaminases are another family of enzymes for cellular adhesion, in which transglutaminase 2 plays a major role in the relaxation of extracellular matrix and the regulation of MMP2 [160]. Enzymes of the kallikrein family have also been found to play a role in extracellular matrix degradation [161] (Fig. 4).

The last phases of metastasis progression consist in the final hosting of the cells groups in the peritoneal tissues. This mainly consists in the recruitment of new blood vessels within the host tissue in order to provide a complete nutritional autonomy to the new tumor site. VEGFs are then needed to stimulate vascular lymphatic endothelium in order

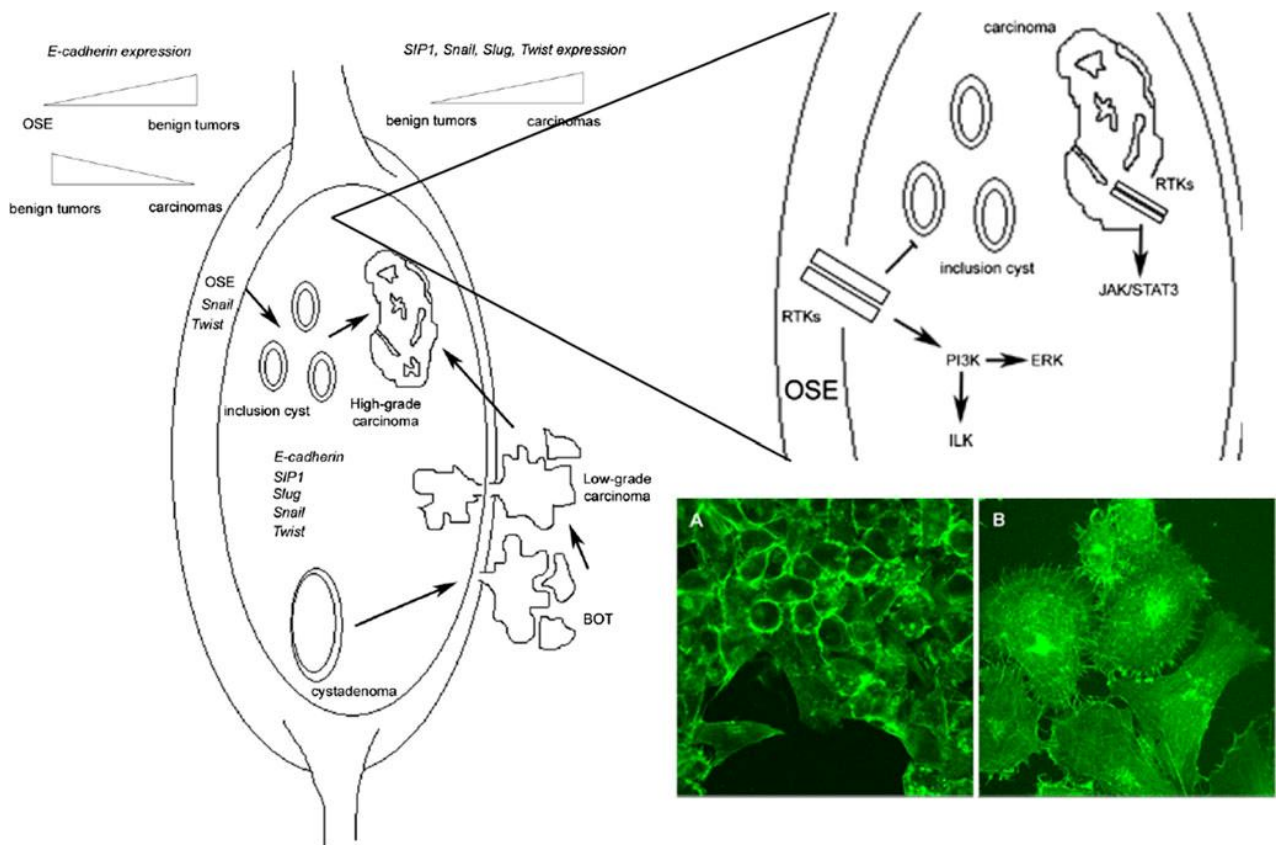


Fig. 4 Schematic illustration of E-cadherin, SIP1, Snail, Slug, and Twist during ovarian progression. A model has been proposed by Shih and Kurman in 2004 to explain ovarian cancer progression [83]. In this model, epithelial ovarian tumors have been classified into two broad categories: type I tumors including low-grade serous carcinomas, mucinous, endometrioid, and clear cells carcinomas seem to develop from their precursors, namely borderline ovarian tumors (BOTs), in a step-wise manner; type II including high-grade serous malignancies develop from the OSE or inclusion cysts without a common precursor. OSE cells covering the ovarian surface do not express E-cadherin but are positive for Snail and Twist expression. As depicted, E-cadherin expression changes during ovarian cancer progression showing an inverse correlation compared to SIP1, Snail, Slug and Twist expression. The zoom corresponds to A simplified overview of signalling network

to create new blood and lymphatic vessels. This process is the very last step of metastasis, that's why the expression of VEGF in ovarian carcinoma context is generally associated to poor prognosis [162]. Periostin has also been explored for its ability to require angiogenesis, in addition to known effects on EMT process [163].

As mentioned above, the environmental context provided by the ascites is of great influence on properties of ovarian cancer cells. It has been established that chemokines such as CXCL12 induces migration, integrin expression, proliferation, and invasion [164]. CCL25–CCR9 interaction also contributes to ovarian cancer migration, metalloprotease expression, and invasion [165]. The hosting tissue is particularly important for metastasis efficiency since adipocytes

regulating EGF-induced EMT. In OSE cells, activation of the EGF receptor tyrosine kinases (RTKs) by EGF results in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), which activates ILK and ERK pathways. EGF treated OSE cells display a molecular signature characteristic of EMT and are less likely to undergo a conversion in inclusion cysts. JAK/STAT3 pathway is required to induce EMT in ovarian cancer cells. Ovarian cancer cells that undergo EMT lose the expression of E-cadherin and NGAL and show an increased motility [82]). Pictures illustrate human epithelial ovarian cancer cell line SKOV3 treated with (b) or without (a) TGF- β (10 ng ml^{-1}). A Control cells have a typical epithelial-like morphology in culture flask/Petri with the tendency to form dense colonies. The filamentous actin cytoskeleton shows circumferential organization. b Protusive structures and actin stress fibers are clearly visible only in treated cells

of the omentum, which is a common site for ovarian tumor dissemination, can interact with the cells groups by adipokines such as IL8. IL8 can mediate homing, migration, and invasion of ovarian cancer cells. Besides, adipocytes can induce β -oxidation in cancer cells. Finally, the fatty-acid-binding protein 4 has been found to be overexpressed and plays a key role in ovarian cancer cells [166]. The cellular context in the peritoneum is also of high relevance. For example, cancer-associated fibroblasts (CAF) promote angiogenesis and lymphangiogenesis, tumor progression and metastasis by secreting different growth factors in the peritoneal environment [167].

Recent “omics” studies aimed to explore the complete molecular aspects of ovarian cancer metastasis.

In 2010, Xu team established an *in vivo* model of ovarian cancer metastasis by injecting the well-known SKOV-3 cell line in nude mice peritoneum [168]. Then, serum proteins of the mice were analyzed by LC-MS/MS. Thirteen human proteins were identified, including three proteins that were highly relevant biomarkers for ovarian cancer metastasis. These candidates were tested for their relevance in blood screening of biomarkers by ELISA assays for patients with different stages of cancer progression. 14-3-3 zeta was found to have 90 %, 82.5 %, 72 %, and 94.3 % sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV), respectively, for stage I and stage II patients. 14-3-3 zeta is an adaptor protein that binds to other upstream or downstream signaling molecules containing tandem repeats of phosphoserine motifs [169,170] and has been found to form a ternary complex with integrin alpha-4 to accelerate cell migration [171]. This study highlights that metastasis of ovarian cancer is an early event since a protein involved in this behavior can be detected as a biomarker for early ovarian cancer. In another study, another member of the 14-3-3 family, 14-3-3 sigma, has been found to protect the cancer against oxidative stress by inducing an insensitiveness of the cells to high O₂ concentrations [172].

In 2011, Kakar team aimed for insights into the “metabolome” of ovarian cancer using GC/MS-TOF [173]. By this approach, they have been able to deduce the metabolic pathways involved in ovarian cancer metastasis behavior. This study revealed that ovarian cancer metastasis have altered carbohydrate metabolism. The ovarian cancer metastatic cells prefer to use glucose for anaerobic glycolysis instead of oxidative phosphorylation for the generation of ATP. This was revealed by an increased level of lactate. Fucose was also increased, coinciding with the elevated glycoproteins in ovarian cancer cells. Also, stimulation of proliferation has been related to the overconcentration of phenylactates. Antioxidants have also been found such as tocopherols and glutathione, concurring with previous studies of protective behavior of ovarian metastatic cells against oxidative stress.

Recently, using MALDI mass spectrometry imaging coupled to on tissue microproteomics, we discovered in ovarian carcinoma proteins involved in metabolic processes particularly over-expressed like the pyruvate kinase isoenzyme M1/M2 (PKM2), the Vitamin D binding protein isoform 2 (DBP), the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1), the fatty acid-binding protein (FABP), the coactivator of PPAR-gamma-like proteins (Longuespée unpublished data). These results reinforced the close correlation between proteome and metabolome expression during ovarian cancer metastasis.

Clearly, the results prove that novel tools, combined with appropriate models could be used to understand the specific mechanisms required for ovarian cancer metastasis.

5 Relevant biomarkers for clinical diagnosis of ovarian cancer

Amongst the molecules discovered and integrated in the understanding of OVC process mechanisms, some have been evaluated for their clinical relevance. In this part of the review, we have summarized the most promising markers that could be used for OVC screening in women populations. To date, CA 125 is the most widely used marker for the disease screening. In normal physiological conditions, ovary surface epithelium does not express CA 125 [174]. The level of seric CA 125 is considered as normal when it is not higher than 35 U/mL [175]. Levels higher than 35 U/mL are found in 90 % of patients with advanced stage disease and in 50 % of stage I cancer patients [176]. CA 125 is exclusively used to monitor the effect of chemotherapies or targeted therapies on the disease. Thus, it is useless for the screening of large scale supervision of the healthiness of postmenopausal women.

The detection of molecular factors for ovarian cancer process was then undertaken in large cohorts of patients and found to provide relatively good results for ovarian cancer screening. Interleukin 13 (IL13) is a cytokine with an inflammatory activity that plays important roles in many biological activities. The level of this cytokine has been measured and found more elevated in cancerous tissues [177]. IL13 receptor is composed by two strands (IL13Ra1 and IL13Ra2) and the second one has been found in high levels in 44 of 53 of ovarian cancer samples [178]. A cytotoxic therapy mediated by IL-13 have been designed and tested in phase I/II clinical trial. This therapy showed an antitumor activity and was very efficient when administered intraperitoneally, since it blocks the spread of ovarian cancer cells through the peritoneum in late stages of ovarian cancer [178]. The serum macrophage inhibitory factor MIF have also been tested for its presence in the blood of ovarian cancer patients and a sensitivity of 77.8 % and a specificity of 53.3 % were measured for this marker [116]. HE4 has also been identified as a potential discriminator of ovarian cancers [179]. This marker, tested in blinded studies on post menopausal patients, was found to have similar discriminating characteristics to CA 125. Many markers were found to be much more efficient for ovarian cancer discrimination, when used in conjunction of CA 125. Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) [180] has been used alone and detected ovarian cancer with a specificity of around 61–68 % and 93 % specificity [181], but the results for the detection were better when used in conjunction with CA 125 [182]. Indeed, the use of either CA 125 or M-CSF enabled the identification of 96–98 % of ovarian cancers and 81 % of early stages [180]. Another marker, the lysophosphatidic acid, has been reported to have a sensitivity of 100 % for high stages cancers and 90 % for stage I cancers [183]. Some

panels of biomarkers have also been proposed for high sensitivity/specificity tests of ovarian cancer screening. The use of the combination of 5 markers (CA 125, OVX1, LASA, CA 15-3, CA 72-4) showed sensitivity of 90.6 % and specificity of 93.2 %, when included in CART analysis (classification and regression tree analysis), which is a marker-based classification algorithm of the disease [184]. Four other markers (CA 125, CA72-4, CA 15-3, and PLA) were found to have a sensitivity from 68 % to 87 % and the same specificity as for CA 125 [185]. Thus, the use of panels of biomarkers seems to be mandatory for biomarker screening. This is particularly well illustrated by the study of Leiser and coll. who proposed the use of six markers (leptin, prolactin, osteopontin, IGFII, MIF, and CA 125) to discriminate ovarian cancer and benign tissues with an accuracy of 89 % for early stages cancers and 100 % for late stage disease. However, none of these markers used alone was able to discriminate properly diseased and unaffected samples [186]. Recently, association of some of the markers presented here, namely mesothelin, osteopontin, and HE4 have been selected by the Specialized Program of Research Excellence (SPORE) committee for their good sensitivity and specificity values [187].

6 Conclusion

This review attempts to link OVC genes polymorphisms to cell signaling pathways which play a central role in cancer cell growth, survival, invasion metastasis, and immune escape.

The integration of these OVC data, as a function of the grade and tumor type, with specific sets of markers is important in order to link the pathology with improved diagnosis and even for therapeutic benefits. The clinical relevance of these OVC molecular factors then need to be validated by large scale screening studies of patient samples, with an emphasis on attempting to screen in the early stages of the diseases. The development of proteomic approaches in the field of biomarkers research has greatly enhanced the discovery of relevant molecular markers for multiple diseases. In the case of OVC, these new markers could provide an alternative strategy to the actual CA 125 monitoring test.

In this review, we conclude that MALDI-MSI is one of the most promising proteomic methods for biomarker discovery, as it allows the direct analysis of tissue sections and large scale screening of markers in their anatomical context. The growing interest for MALDI-MSI in the proteomics community is due to the increasing ease of use, great accuracy, and statistical power, as it is now combined with adapted statistical tools. MALDI-MSI may soon become the primary approach for the biomarkers discovery. In this review, we also conclude as to the difficulty in correlating between predicting important genes in pathologies and biomarker detection in tissue and in serum. Nevertheless, the association multiplex panel of biomarkers has also been proposed to increase the sensitivity/specificity testing of ovarian cancer screening associated with CA125. Novel biomarkers identified by MALDI-MSI, i.e., the C-terminal fragment of Reg-alpha and Mucin 9 as well as specific viral signatures

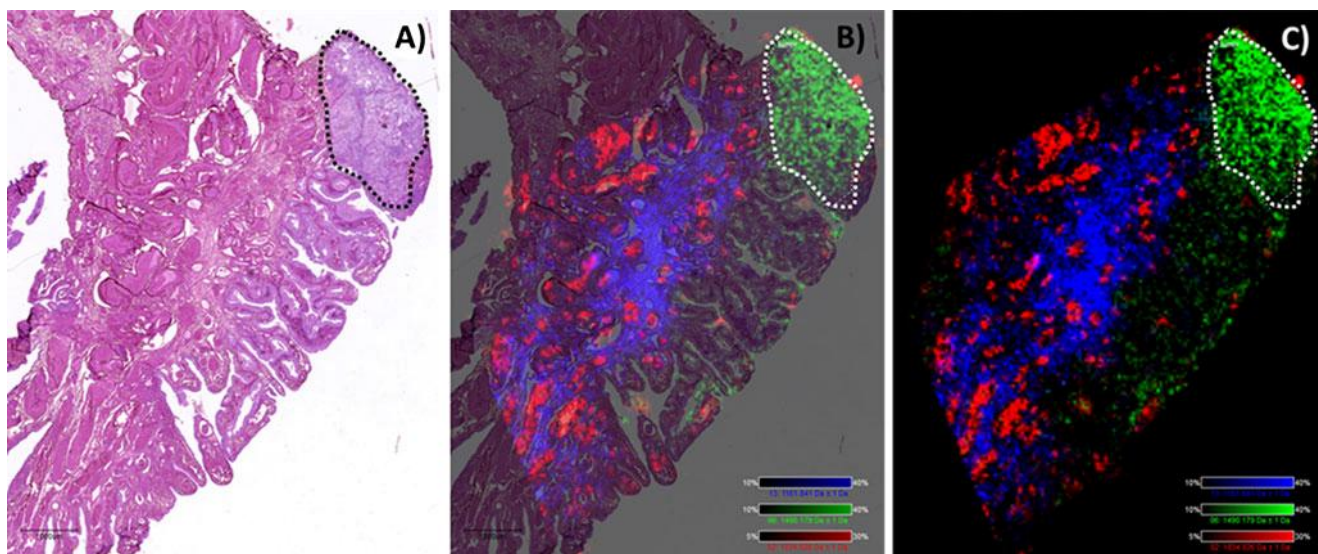


Fig. 5 Molecular localization of three different ions on a FFPE tissue section in the region Fimbria of the uterine tube. Histological section after hematoxylin eosin-safran (HES) coloration (a). Ions images at a spatial resolution of 50 μm with (b) or without (c) a superposition of

the histological image. Three specific molecules were localized in the blood vessel (in red), in the mesothelium (in blue) and specific to the cancer region (in green)

(EBV, HHV6) may allow the assembly of more complete biomarker panels for early ovarian cancer diagnosis. In order to increase specificity, it will be necessary to take into account not only protein biomarkers linked to cell modifications but also the presence of specific viral proteins, the etiology of the pathology (e.g., the Mullerian cell origin of ovarian serous cancer) and their specific markers. Most ovarian carcinomas associated with deleterious mutations BRCA1/2 appear to derive from the tube, especially its fimbria. These cancers are almost always high-grade serous ovarian, tubal, or peritoneal. Given the ineffectiveness of current screening, bilateral salpingo-oophorectomy is the preferred prophylactic procedure. This procedure is not without consequences and in view of pathogenesis data reviewed, it may be possible to perform a temporary prophylaxis in the form of a bilateral radical fimbriectomy. Recent histopathological studies support the possibility of tumors forming at epithelial-mesothelial junctions (peritoneal mesothelioma between epithelium and Mullerian or between tubal epithelium and tubal and ovarian mesothelium lining). This hypothesis is in line with tumors cervix or the cardia which are also “pathologies junction” between coatings of different natures. The hypothesis of an abnormal spread of cells on the cortical tubal or ovarian inclusion cysts, and their development into carcinoma, is corroborated by very recent biomolecular studies. They confirm the expression by cancer cells of high-grade serous mullerian markers (like the duct) but not mesothelium (such as ovarian cortex) [188–190]. Hypothesis that can be drawn is the fact that high-grade serous carcinoma would be a secondary malignance of the ovary and not a primary ovarian tumor Type 1 lesions will find their origin in the carcinogenesis of inclusion cysts post-ovulation, which, during the healing of the breach ovarian tissue would then reflect a Mullerian origin [188–190]. The type of carcinoma depends on the origin of these Mullerian cells. It is therefore necessary to integrate these notions in ovarian cancer diagnosis and identify specific markers in relation with these Mullerian cells. MALDI-MSI (Fig. 5) can offer versatile and powerful methods to investigate these junctions, on specimens of prophylactic oophorectomy or in fimbriectomies with mutated BRCA 1/2, in order to detect early abnormalities and help explain tumor development while identifying early disease biomarkers.

Acknowledgements Supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to IF), Institut du Cancer (INCA to IF), Institut de Recherche en Santé du Canada (ISRC to MS & RD), the Ministère du Développement Économique de l'Innovation et de l'Exportation (MDEIE to R.D), the Fond de la recherche du Québec Santé (FRQS to R.D), the Université de Sherbrooke and the Région Nord-Pas de Calais (to RL). R.D. is a member of the Centre de Recherche Clinique Etienne-Le Bel (Sherbrooke, Qc, Canada).

References

- Longuespée RB, C., Kerdraon, O., Vinatier, D., Fournier, I., Day, R., Salzet, M. (2012). MALDI MSI and Ovarian cancer Bio- markers. *Advances in Cancer Management*; Ed R. Mohan, Chap. 10, 211–236.
- Jelovac, D., Armstrong, D.K. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 183–203.
- Konishi, H., Mohseni, M., Tamaki, A, et al. 2011. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17773–17778.
- Saunders, K.H., Nazareth, S., Pressman, P.I. (2011). Case report: BRCA in the Ashkenazi population: are current testing guidelines too exclusive? *Heredity Cancer Clinical Practice*, 9(1), 3.
- Jazaeri, A. A. (2009). Molecular profiles of hereditary epithelial ovarian cancers and their implications for the biology of this disease. *Molecular Oncology*, 3, 151–156.
- Bast, R. C., Jr., Hennessy, B., & Mills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature Reviews. Cancer*, 9, 415–428.
- Moore, L.E., Pfeiffer, R.M., Zhang, Z., Lu, K.H., Fung, E.T., Bast, R.C., Jr. (2012). Proteomic biomarkers in combination with CA 125 for detection of epithelial ovarian cancer using pre-diagnostic serum samples from the prostate, lung, colorectal, and ovarian (PLCO) cancer screening trial. *Cancer*, 118(1), 91–100.
- Vaughan, S., Coward, J. I., Bast, R. C., Jr., et al. (2011). Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nature Reviews. Cancer*, 11, 719–725.
- Moore, R. G., MacLaughlan, S., & Bast, R. C., Jr. (2010). Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 116, 240–245.
- Lu, Z., & Bast, R. C., Jr. (2009). Tumor suppressor genes. *Cancer Treatment and Research*, 149, 109–129.
- Samanta, A. K., Huang, H. J., Le, X. F., et al. (2009). MEKK3 expression correlates with nuclear factor kappa B activity and with expression of antiapoptotic genes in serous ovarian carcinoma. *Cancer*, 115, 3897–3908.
- Huang, S., Chang, I.S., Lin, W., et al. 2009. ARHI (DIRAS3), an imprinted tumour suppressor gene, binds to importins and blocks nuclear import of cargo proteins. *Bioscience Reports*, 30, 159–168.
- Kan, Z., Jaiswal, B. S., Stinson, J., et al. (2011). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 466, 869–873.
- Bast, R. C., Jr., & Spriggs, D. R. (2011). More than a biomarker: CA125 may contribute to ovarian cancer pathogenesis. *Gynecologic Oncology*, 121, 429–430.
- Zhu, C. S., Pinsky, P. F., Cramer, D. W., et al. (2011). A framework for evaluating biomarkers for early detection: validation of biomarker panels for ovarian cancer. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 4, 375–383.
- Kalachand, R., Hennessy, B. T., & Markman, M. (2011). Molecular targeted therapy in ovarian cancer: what is on the horizon? *Drugs*, 71, 947–967.
- Wilson, E. B., El-Jawahri, J. J., Neilson, A. L., et al. (2001). Human tumour immune evasion via TGF-beta blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity. *PLoS One*, 6, e22842.
- Papacleovoulou, G., Critchley, H., Hillier, S.G., Mason, J.I. (2011). IL-1{alpha} and IL-4 signalling in human ovarian surface epithelial cells. *Journal of Endocrinology*, 211(3), 273–283.
- Barbolina, M. V., Burkhalter, R. J., & Stack, M. S. (2011). Diverse mechanisms for activation of Wnt signalling in

- the ovarian tumour microenvironment. *Biochemistry Journal*, 437, 1–12.
20. Comamala, M., Pinard, M., Theriault, C., et al. (2011). Down-regulation of cell surface CA125/MUC16 induces epithelial-to-mesenchymal transition and restores EGFR signalling in NIH: OVCAR3 ovarian carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 104, 989–999.
 21. Mazzeletti, M., & Brogini, M. (2010). PI3K/AKT/mTOR inhibitors in ovarian cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 4433–4447.
 22. Hipp, S., Berg, D., Ergin, B., et al. (2010). Interaction of Snail and p38 mitogen-activated protein kinase results in shorter overall survival of ovarian cancer patients. *Virchows Archiv*, 457, 705–713.
 23. Bolitho, C., Hahn, M. A., Baxter, R. C., & Marsh, D. J. (2010). The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocrine-Related Cancer*, 17, 929–940.
 24. Mertens-Walker, I., Bolitho, C., Baxter, R. C., & Marsh, D. J. (2010). Gonadotropin-induced ovarian cancer cell migration and proliferation require extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation regulated by calcium and protein kinase C $\{\delta\}$. *Endocrine-Related Cancer*, 17, 335–349.
 25. Falasca, M., Chiozzotto, D., Godage, H. Y., et al. (2010). A novel inhibitor of the PI3K/Akt pathway based on the structure of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate. *British Journal of Cancer*, 102, 104–114.
 26. Drummond, A. E., & Fuller, P. J. (2010). The importance of ERbeta signalling in the ovary. *Journal of Endocrinology*, 205, 15–23.
 27. Herrera, B., van Dinther, M., Ten Dijke, P., & Inman, G. J. (2009). Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Research*, 69, 9254–9262.
 28. Helleman, J., Jansen, M. P., Burger, C., van der Burg, M. E., & Berns, E. M. (2010). Integrated genomics of chemotherapy resistant ovarian cancer: a role for extracellular matrix, TGFbeta and regulating microRNAs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, 25–30.
 29. Papachroni, K. K., Piperi, C., Levidou, G., et al. Lysyl oxidase interacts with AGE signalling to modulate collagen synthesis in polycystic ovarian tissue. 2010. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 2460–2469.
 30. Wang, Y., Nicholls, P. K., Stanton, P. G., et al. (2009). Extra-ovarian expression and activity of growth differentiation factor 9. *Journal of Endocrinology*, 202, 419–430.
 31. Drake, J., Shearwood, A. M., White, J., et al. (2009). Expression of secreted frizzled-related protein 4 (SFRP4) in primary serous ovarian tumours. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 30, 133–141.
 32. Santra, M. K., Wajapeyee, N., & Green, M. R. (2009). F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature*, 459, 722–725.
 33. Trinh, X. B., Tjalma, W. A., Vermeulen, P. B., et al. (2009). The VEGF pathway and the AKT/mTOR/p70S6K1 signalling pathway in human epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 100, 971–978.
 34. Colomiere, M., Ward, A. C., Riley, C., et al. (2009). Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *British Journal of Cancer*, 100, 134–144.
 35. Kolasa, I. K., Rembiszewska, A., Felisiak, A., et al. (2009). PIK3CA amplification associates with resistance to chemotherapy in ovarian cancer patients. *Cancer Biology & Therapy*, 8, 21–26.
 36. Noske, A., Lindenberg, J. L., Darb-Esfahani, S., et al. (2008). Activation of mTOR in a subgroup of ovarian carcinomas: correlation with p-eIF-4E and prognosis. *Oncology Reports*, 20, 1409–1417.
 37. Colomiere, M., Findlay, J., Ackland, L., & Ahmed, N. (2009). Epidermal growth factor-induced ovarian carcinoma cell migration is associated with JAK2/STAT3 signals and changes in the abundance and localization of alpha6beta1 integrin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1034–1045.
 38. Papacleovoulou, G., Edmondson, R. J., Critchley, H. O., Hillier, S. G., & Mason, J. I. (2009). 3beta-Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor steroid metabolism in the human ovarian surface epithelium. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301, 65–73.
 39. de Graeff, P., Crijns, A. P., Ten Hoor, K. A., et al. (2008). The ErbB signalling pathway: protein expression and prognostic value in epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 99, 341–349.
 40. Bleeker, F. E., Felicioni, L., Buttitta, F., et al. (2008). AKT1 (E17K) in human solid tumours. *Oncogene*, 27, 5648–5650.
 41. Guo, R. X., Qiao, Y. H., Zhou, Y., Li, L. X., Shi, H. R., & Chen, K. S. (2008). Increased staining for phosphorylated AKT and nuclear factor-kappaB p65 and their relationship with prognosis in epithelial ovarian cancer. *Pathology International*, 58, 749–756.
 42. Guo, L. M., Pu, Y., Han, Z., et al. (2009). MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF-kappaB1. *FEBS Journal*, 276, 5537–5546.
 43. Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441, 431–436.
 44. Karin, M. (2006). NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Molecular Carcinogenesis*, 45, 355–361.
 45. Karin, M., Lawrence, T., & Nizet, V. (2006). Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, 124, 823–835.
 46. Manzano, R. G., Montuenga, L. M., Dayton, M., et al. (2002). CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential. *Oncogene*, 21, 4435–4447.
 47. Lengyel, E., Stepp, E., Gum, R., & Boyd, D. (1995). Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promoter activity by c-Ha-ras. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 23007–23012.
 48. Felip, E., Encabo, G., Vidal, M. T., Vera, R., del Campo, J. M., & Rubio, D. (1995). C-erbB-2 protein in ovarian epithelial cancer: correlation between expression in tumor tissue and blood levels. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 105, 5–8.
 49. Felip, E., Del Campo, J. M., Rubio, D., Vidal, M. T., Colomer, R., & Bermejo, B. (1995). Overexpression of c-erbB-2 in epithelial ovarian cancer. Prognostic value and relationship with response to chemotherapy. *Cancer*, 75, 2147–2152.
 50. Teixeira, J., Maheswaran, S., & Donahoe, P. K. (2001). Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocrine Reviews*, 22, 657–674.
 51. Braun, A. H., & Coffey, R. J. (2005). Lysophosphatidic acid, a disintegrin and metalloprotease-17 and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in ovarian cancer: the first word, not the last. *Clinical Cancer Research*, 11, 4639–4643.
 52. Gewinner, C., Wang, Z. C., Richardson, A., et al. (2009). Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell*, 16, 115–125.
 53. Imamov, O., Shim, G. J., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2005). Estrogen receptor beta in health and disease. *Biology of Reproduction*, 73, 866–871.
 54. Lindgren, P. R., Cajander, S., Backstrom, T., Gustafsson, J. A., Makela, S., & Olofsson, J. I. (2004). Estrogen and progesterone

- receptors in ovarian epithelial tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 221, 97–104.
55. Li, A. J., Baldwin, R. L., & Karlan, B. Y. (2003). Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189, 22–27.
 56. Lazennec, G. (2005). Retraction: article on estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Research*, 65, 5480.
 57. Ye, B., Cramer, D. W., Skates, S. J., et al. (2003). Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clinical Cancer Research*, 9, 2904–2911.
 58. Yu, J. K., Zheng, S., Tang, Y., & Li, L. (2005). An integrated approach utilizing proteomics and bioinformatics to detect ovarian cancer. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6, 227–231.
 59. Conrads, T. P., Fusaro, V. A., Ross, S., et al. (2004). High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. *Endocrine-Related Cancer*, 11, 163–178.
 60. Zhu, Y., Wu, R., Sangha, N., et al. (2006). Classifications of ovarian cancer tissues by proteomic patterns. *Proteomics*, 6, 5846–5856.
 61. Kim, H., Wu, R., Cho, K. R., et al. (2008). Comparative proteomic analysis of low stage and high stage endometrioid ovarian adenocarcinomas. *Proteomics. Clinical Applications*, 2, 571–584.
 62. Lemaire, R., Menguellat, S. A., Stauber, J., et al. (2007). Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11 S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *Journal of Proteome Research*, 6, 4127–4134.
 63. Franck, J., Arafah, K., Elayed, M., et al. (2009). MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8, 2023–2033.
 64. Gustafsson, J. O., Oehler, M. K., McColl, S. R., & Hoffmann, P. (2010). Citric acid antigen retrieval (CAAR) for tryptic peptide imaging directly on archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Journal of Proteome Research*, 9, 4315–4328.
 65. Gustafsson, J. O., Oehler, M. K., Ruzkiewicz, A., McColl, S. R., & Hoffmann, P. (2011). MALDI Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS)-Application of Spatial Proteomics for Ovarian Cancer Classification and Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 773–794.
 66. Kikuchi, N., Horiuchi, A., Osada, R., et al. (2006). Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Science*, 97, 1061–1069.
 67. El Ayed, M., Bonnel, D., Longuespee, R., et al. (2010). MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Medical Science Monitor*, 16, BR233–BR245.
 68. Gortzak-Uzan, L., Ignatchenko, A., Evangelou, A. I., et al. (2008). A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *Journal of Proteome Research*, 7, 339–351.
 69. Makino, E., Sakaguchi, M., Iwatsuki, K., & Huh, N. H. (2004). Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death. *Journal of Molecular Medicine*, 82, 612–620.
 70. Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Sonogawa, H., et al. (2004). PKCalpha mediates TGFbeta-induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *The Journal of Cell Biology*, 164, 979–984.
 71. Yang, Z., Tao, T., Raftery, M. J., Youssef, P., Di Girolamo, N., & Geczy, C. L. (2001). Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *Journal of Leukocyte Biology*, 69, 986–994.
 72. Do, T. V., Kubba, L. A., Du, H., Sturgis, C. D., & Woodruff, T. K. (2008). Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular Cancer Research*, 6, 695–705.
 73. Rodriguez, G. C., Haisley, C., Hurteau, J., et al. (2001). Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor-beta. *Gynecologic Oncology*, 80, 245–253.
 74. Sood, A. K., Fletcher, M. S., Coffin, J. E., et al. (2004). Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190, 899–909.
 75. Sood, A. K., Seftor, E. A., Fletcher, M. S., et al. (2001). Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *American Journal of Pathology*, 158, 1279–1288.
 76. Vergara, D., Merlot, B., Lucot, J.P., et al. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Letters*, 291 (1), 59–66.
 77. Giuntoli, R. L., 2nd, Webb, T. J., Zoso, A., et al. (2009). Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Research*, 29, 2875–2884.
 78. Xie, X., Ye, D., Chen, H., Lu, W., Cheng, B., & Zhong, H. (2004). Interleukin-7 and suppression of local peritoneal immunity in ovarian carcinoma. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 85, 151–158.
 79. Lambeck, A. J., Crijns, A. P., Leffers, N., et al. (2007). Serum cytokine profiling as a diagnostic and prognostic tool in ovarian cancer: a potential role for interleukin 7. *Clinical Cancer Research*, 13, 2385–2391.
 80. Kitagawa, K., Murata, A., Matsuura, N., et al. (1996). Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor-beta1. *International Journal of Cancer*, 66, 91–97.
 81. Keshamouni, V. G., Michailidis, G., Grasso, C. S., et al. (2006). Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype. *Journal of Proteome Research*, 5, 1143–1154.
 82. Vergara, D., Merlot, B., Lucot, J. P., et al. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Letters*, 291, 59–66.
 83. Mor, G., Visintin, I., Lai, Y., et al. (2005). Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7677–7682.
 84. Choi, J. H., Lee, K. T., & Leung, P. C. (2011). Estrogen receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth. *Carcinogenesis*, 32, 589–596.
 85. Levina, V. V., Nolen, B., Su, Y., et al. (2009). Biological significance of prolactin in gynecologic cancers. *Cancer Research*, 69, 5226–5233.
 86. Song, G., Cai, Q. F., Mao, Y. B., Ming, Y. L., Bao, S. D., & Ouyang, G. L. (2008). Osteopontin promotes ovarian cancer progression and cell survival and increases HIF-1alpha expression through the PI3-K/Akt pathway. *Cancer Science*, 99, 1901–1907.
 87. Lee, E. J., Mircean, C., Shmulevich, I., et al. (2005). Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes ovarian cancer cell invasion. *Molecular Cancer*, 4, 7.
 88. Guo, X., Liu, G., Schauer, I. G., et al. (2011). Overexpression of the beta subunit of human chorionic gonadotropin promotes the transformation of human ovarian epithelial cells and ovarian tumorigenesis. *American Journal of Pathology*, 179, 1385–1393.
 89. Boss, D.S., Glen, H., Beijnen, J.H., et al. Serum beta-HCG and CA-125 as tumor markers in a patient with osteosarcoma: case report. *Tumori*, 97, 109–114.
 90. Pejcić, I., Vrbic, S., Filipovic, S., et al. (2010). [Significance of serum tumor markers monitoring metastases in carcinomas of unknown primary site]. *Vojnosanitetski Pregled*, 67, 723–731.

91. Tavares Murta, B. M., Cunha Fde, Q., Miranda, R., Adad, S. J., & Murta, E. F. (2004). Differential tumor microenvironment in human ovarian cystic tumors. *Tumori*, 90, 491–497.
92. Perkins, G. L., Slater, E. D., Sanders, G. K., & Prichard, J. G. (2003). Serum tumor markers. *American Family Physician*, 68, 1075–1082.
93. Clarke, B., Tinker, A. V., Lee, C. H., et al. (2009). Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Modern Pathology*, 22, 393–402.
94. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10, 942–949.
95. Preston, C. C., Goode, E. L., Hartmann, L. C., Kalli, K. R., & Knutson, K. L. (2011). Immunity and immune suppression in human ovarian cancer. *Immunotherapy*, 3, 539–556.
96. Yigit, R., Massuger, L. F., Figdor, C. G., & Torensma, R. (2010). Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecologic Oncology*, 117, 366–372.
97. Nonaka, H., Saga, Y., Fujiwara, H., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through inhibition of natural killer cell function and angiogenesis promotion. *International Journal of Oncology*, 38, 113–120.
98. Ino, K. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase and immune tolerance in ovarian cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 23, 13–18.
99. Inaba, T., Ino, K., Kajiyama, H., et al. (2009). Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 115, 185–192.
100. Okamoto, A., Nikaido, T., Ochiai, K., et al. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 11, 6030–6039.
101. Nelson, B. H. (2009). IDO and outcomes in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 115, 179–180.
102. Loercher, A. E., Nash, M. A., Kavanagh, J. J., Platsoucas, C. D., & Freedman, R. S. (1999). Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells. *The Journal of Immunology*, 163, 6251–6260.
103. Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., et al. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 65, 5020–5026.
104. Jung, Y. W., Kim, Y. T., Kim, S. W., et al. (2009). Correlation of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression and disease progression in epithelial ovarian cancer. *Reproductive Sciences*, 16, 1103–1111.
105. Menier, C., Prevot, S., Carosella, E. D., & Rouas-Freiss, N. (2009). Human leukocyte antigen-G is expressed in advanced-stage ovarian carcinoma of high-grade histology. *Human Immunology*, 70, 1006–1009.
106. Sheu, J. J., & Shih Ie, M. (2007). Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 436–443.
107. Rebmann, V., Regel, J., Stolke, D., & Grosse-Wilde, H. (2003). Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Seminars in Cancer Biology*, 13, 371–377.
108. Singer, G., Rebmann, V., Chen, Y. C., et al. (2003). HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clinical Cancer Research*, 9, 4460–4464.
109. Mach, P., Blecharz, P., Basta, P., et al. (2010). Differences in the soluble HLA-G blood serum concentration levels in patients with ovarian cancer and ovarian and deep endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63, 387–395.
110. Lin, A., Yan, W. H., Xu, H. H., et al. (2007). HLA-G expression in human ovarian carcinoma counteracts NK cell function. *Annals of Oncology*, 18, 1804–1809.
111. Simon, I., & Katsaros, D. (2007). Rigault de la Longrais I, et al. B7-H4 is over-expressed in early-stage ovarian cancer and is independent of CA125 expression. *Gynecologic Oncology*, 106, 334–341.
112. Simon, I., Liu, Y., Krall, K. L., et al. (2007). Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spodin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 106, 112–118.
113. Simon, I., Zhuo, S., Corral, L., et al. (2006). B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue bio-marker for ovarian cancer. *Cancer Research*, 66, 1570–1575.
114. Gubbels, J. A., Felder, M., Horibata, S., et al. (2010). MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Molecular Cancer*, 9.
115. Krockenberger, M., Dombrowski, Y., Weidler, C., et al. (2008). Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D. *The Journal of Immunology*, 180, 7338–7348.
116. Agarwal, R., Whang, D. H., Alvero, A. B., et al. (2007). Macrophage migration inhibitory factor expression in ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196, 348 e1–348 e5.
117. Sonoda, K., Miyamoto, S., Yotsumoto, F., et al. (2007). Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of ovarian cancer. *Oncology Reports*, 17, 623–628.
118. McGilvray, R. W., Eagle, R. A., Rolland, P., Jafferji, I., Trowsdale, J., & Durrant, L. G. (2010). ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *International Journal of Cancer*, 127, 1412–1420.
119. Franck, J., Longuespee, R., Wisztorski, M., et al. (2010). MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. *Medical Science Monitor*, 16, BR293–BR299.
120. Lemaire, R., Lucot, J. P., Collinet, P., Vinatier, D., Tabet, J. C., Salzet, M., & Fournier, I. (2005). New developments in direct analyses by MALDI mass spectrometry for study ovarian cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, S305–S308.
121. Yang, Y., Fruh, K., Ahn, K., & Peterson, P. A. (1995). In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 27687–27694.
122. Kloetzel, P. M. (1998). The proteasome system: a neglected tool for improvement of novel therapeutic strategies? *Gene Therapy*, 5, 1297–1298.
123. Rivett, A. J., & Gardner, R. C. (2000). Proteasome inhibitors: from in vitro uses to clinical trials. *Journal of Peptide Science*, 6, 478–488.
124. Rotem-Yehudar, R., Groettrup, M., Soza, A., Kloetzel, P. M., & Ehrlich, R. (1996). LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *The Journal of Experimental Medicine*, 183, 499–514.
125. Kuckelkorn, U., Ruppert, T., Strehl, B., et al. (2002). Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 195, 983–990.
126. Regad, T., Saib, A., Lallemand-Breitenbach, V., Pandolfi, P. P., de The, H., & Chelbi-Alix, M. K. (2001). PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO Journal*, 20, 3495–3505.
127. Delp, K., Momburg, F., Hilmes, C., Huber, C., & Seliger, B. (2000). Functional deficiencies of components of the MHC class

- I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplantation*, 25(Suppl 2), S88–S95.
128. Sorem, J., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2009). Cleavage and secretion of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 promote membrane fusion with B lymphocytes. *Journal of Virology*, 83, 6664–6672.
 129. Sorem, J., & Longnecker, R. (2009). Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *Journal of General Virology*, 90, 591–595.
 130. Pudney, V. A., Leese, A. M., Rickinson, A. B., & Hislop, A. D. (2005). CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201, 349–360.
 131. Elg, S. A., Mayer, A. R., Carson, L. F., Twigg, L. B., Hill, R. B., & Ramakrishnan, S. (1997). Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovarian carcinoma. *Cancer*, 80, 1448–1456.
 132. Nosov, V., Su, F., Amneus, M., et al. (2009). Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 200, 639 e1–639 e5.
 133. Kim, K. D., Lim, H. Y., Lee, H. G., et al. (2005). Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 1126–1136.
 134. Liang, X., Lin, T., Sun, G., Beasley-Toppliffe, L., Cavaillon, J. M., & Warren, H. S. (2009). Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 86, 229–235.
 135. Leygue, E., Snell, L., Dotzlaw, H., et al. (1998). Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Research*, 58, 1348–1352.
 136. Leygue, E., Snell, L., Dotzlaw, H., et al. (2000). Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *The Journal of Pathology*, 192, 313–320.
 137. Babelova, A., Moreth, K., Tsalastra-Greul, W., et al. (2009). Biglycan: A danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24035–24048.
 138. Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., et al. (2005). The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2223–2233.
 139. Salzet, M., Capron, A., & Stefano, G. B. (2000). Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitology Today*, 16, 536–540.
 140. Huber, M. A., Kraut, N., & Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 548–558.
 141. Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 4, 118–132.
 142. Ponnusamy, M. P., Lakshmanan, I., Jain, M., et al. (2010). MUC4 mucin-induced epithelial to mesenchymal transition: a novel mechanism for metastasis of human ovarian cancer cells. *Oncogene*, 29, 5741–5754.
 143. Hudson, L. G., Zeineldin, R., & Stack, M. S. (2008). Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25, 643–655.
 144. Imai, T., Horiuchi, A., Wang, C., et al. (2003). Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *American Journal of Pathology*, 163, 1437–1447.
 145. Byrne, A. T., Ross, L., Holash, J., et al. (2003). Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clinical Cancer Research*, 9, 5721–5728.
 146. Bartlett, J. M., Langdon, S. P., Simpson, B. J., et al. (1996). The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 73, 301–306.
 147. Symowicz, J., Adley, B. P., Gleason, K. J., et al. (2007). Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Research*, 67, 2030–2039.
 148. Ellerbroek, S. M., Halbleib, J. M., Benavidez, M., et al. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Research*, 61, 1855–1861.
 149. Nagy, J. A., Masse, E. M., Herzberg, K. T., et al. (1995). Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Research*, 55, 360–368.
 150. Casey, R. C., Burleson, K. M., Skubit, K. M., et al. (2001). Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *American Journal of Pathology*, 159, 2071–2080.
 151. Shield, K., Riley, C., Quinn, M. A., Rice, G. E., Ackland, M. L., & Ahmed, N. (2007). Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. *Journal of Carcinogenesis*, 6, 11.
 152. Moss, N. M., Barbolina, M. V., Liu, Y., Sun, L., Munshi, H. G., & Stack, M. S. (2009). Ovarian cancer cell detachment and multicellular aggregate formation are regulated by membrane type 1 matrix metalloproteinase: a potential role in intraperitoneal dissemination. *Cancer Research*, 69, 7121–7129.
 153. Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., et al. (2001). Expression of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases messenger RNA in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *American Journal of Clinical Pathology*, 115, 517–524.
 154. Slack-Davis, J. K., Atkins, K. A., Harrer, C., Hershey, E. D., & Conaway, M. (2009). Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Cancer Research*, 69, 1469–1476.
 155. Cannistra, S. A., Kansas, G. S., Niloff, J., DeFranzo, B., Kim, Y., & Ottensmeier, C. (1993). Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Research*, 53, 3830–3838.
 156. Zecchini, S., Bombardelli, L., Decio, A., et al. (2011). The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signalling. *EMBO Molecular Medicine*, 3, 480–494.
 157. Kenny, H. A., Kaur, S., Coussens, L. M., & Lengyel, E. (2008). The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *Journal of Clinical Investigation*, 118, 1367–1379.
 158. Kenny, H. A., & Lengyel, E. (2009). MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell Cycle*, 8, 683–688.
 159. Huang, S., Van Arsdall, M., Tedjarati, S., et al. (2002). Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 94, 1134–1142.
 160. Satpathy, M., Shao, M., Emerson, R., Donner, D. B., & Matei, D. (2009). Tissue transglutaminase regulates matrix metalloproteinase-2 in ovarian cancer by modulating cAMP-response element-binding protein activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 15390–15399.
 161. Dorn, J., Harbeck, N., Kates, R., et al. Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastases in advanced ovarian cancer. *Annals of Oncology*, 22, 877–883.

162. Nishida, N., Yano, H., Komai, K., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2004). Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer*, 101, 1364–1374.
163. Zhu, M., Fejzo, M. S., Anderson, L., et al. (2011). Periostin promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis. *Gynecologic Oncology*, 119, 337–344.
164. Popple, A., Durrant, L. G., Spendlove, I., et al. (2012). The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 106, 1306–1313.
165. Johnson, E. L., Singh, R., Singh, S., et al. (2010). CCL25-CCR9 interaction modulates ovarian cancer cell migration, metalloproteinase expression, and invasion. *World Journal of Surgical Oncology*, 8, 62.
166. Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C.V., et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Natural Medicines*, 17, 1498–1503.
167. Zhang, Y., Tang, H., Cai, J., et al. (2011). Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Letters*, 303, 47–55.
168. He, Y., Wu, X., Liu, X., Yan, G., & Xu, C. (2010). LC-MS/MS analysis of ovarian cancer metastasis-related proteins using a nude mouse model: 14-3-3 zeta as a candidate biomarker. *Journal of Proteome Research*, 9, 6180–6190.
169. Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., et al. (1997). The structural basis for 14-3-3-phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 91, 961–971.
170. Ogihara, T., Isobe, T., Ichimura, T., et al. (1997). 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 25267–25274.
171. Deakin, N. O., Bass, M. D., Warwood, S., et al. (2009). An integrin- α 4-14-3-3zeta-paxillin ternary complex mediates localised Cdc42 activity and accelerates cell migration. *Journal of Cell Science*, 122, 1654–1664.
172. Ravi, D., Chen, Y., Karia, B., et al. 14-3-3 sigma expression effects G2/M response to oxygen and correlates with ovarian cancer metastasis. *PLoS One*, 6, e15864.
173. Fong, M.Y., McDunn, J., Kakar, S.S. Identification of metabolites in the normal ovary and their transformation in primary and metastatic ovarian cancer. *PLoS One*, 6, e19963.
174. Ozols, R. F., Bookman, M. A., Connolly, D. C., et al (2004). Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell*, 5, 19–24.
175. Bast, R. C., Jr., Klug, T. L., St John, E., et al. (1983). A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 309, 883–887.
176. Nustad, K., Bast, R. C., Jr., Brien, T. J., et al. (1996). Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. *International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tumour Biology*, 17, 196–219.
177. Ripley, D., Shoup, B., Majewski, A., & Chegini, N. (2004). Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas. *Gynecologic Oncology*, 92, 761–768.
178. Kioi, M., Kawakami, M., Shimamura, T., Husain, S. R., & Puri, R. K. (2006). Interleukin-13 receptor alpha2 chain: a potential biomarker and molecular target for ovarian cancer therapy. *Cancer*, 107, 1407–1418.
179. Hellstrom, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., et al. (2003). The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 63, 3695–3700.
180. Suzuki, M., Ohwada, M., Aida, I., Tamada, T., Hanamura, T., & Nagatomo, M. (1993). Macrophage colony-stimulating factor as a tumor marker for epithelial ovarian cancer. *Obstetrics and Gynecology*, 82, 946–950.
181. Xu, F. J., Ramakrishnan, S., Daly, L., et al. (1991). Increased serum levels of macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165, 1356–1362.
182. Chechlińska, M., Kaminska, J., Markowska, J., Kramar, A., & Steffen, J. (2007). Peritoneal fluid cytokines and the differential diagnosis of benign and malignant ovarian tumors and residual/recurrent disease examination. *The International Journal of Biological Markers*, 22, 172–180.
183. Xu, Y., Shen, Z., Wiper, D. W., et al. (1998). Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *Journal of the American Medical Association*, 280, 719–723.
184. Woolas, R. P., Conaway, M. R., Xu, F., et al. (1995). Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecologic Oncology*, 59, 111–116.
185. Zhang, Z., Barnhill, S. D., Zhang, H., et al. (1999). Combination of multiple serum markers using an artificial neural network to improve specificity in discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecologic Oncology*, 73, 56–61.
186. Visintin, I., Feng, Z., Longton, G., et al. (2008). Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 14, 1065–1072.
187. Moore, R. G., & Maclaughlan, S. (2010). Current clinical use of biomarkers for epithelial ovarian cancer. *Current Opinion in Oncology*, 22, 492–497.
188. Kurman, R.J., McConnell, T.G. Characterization and comparison of precursors of ovarian and endometrial carcinoma: parts I and II. *International Journal of Surgical Pathology*, 18, 181S–189S.
189. Kurman, R. J., & McConnell, T. G. (2010). Precursors of endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Archiv*, 456, 1–12.
190. Kurman, R. J., & Shih Ie, M. (2010). The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American Journal of Surgical Pathology*, 34, 433–443.
191. Longuespé, R.B., CCastellier, C., Jacquet, E., Desmons, A., Kerdraon, O., Vinatier, D., Day, R., Fournier, I., Salzet, M. The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg Alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling. *Histochem and Cell Biochem* 2012; in press: D.O.I. 10.1007/s00418-012-0953-0.
192. Tinelli, A., Vergara, D., Martignago, R., et al. (2007). Ovarian cancer biomarkers: a focus on genomic and proteomic findings. *Current Genomics*, 8, 335–342.
193. Diefenbach, C. S., Soslow, R. A., Iasonos, A., et al. (2006). Lysophosphatidic acid acyltransferase-beta (LPAAT-beta) is highly expressed in advanced ovarian cancer and is associated with aggressive histology and poor survival. *Cancer*, 107, 1511–1519.
194. Kim, H., Watkinson, J., Varadan, V., & Anastassiou, D. (2010). Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Medical Genomics*, 3, 51.
195. Oikonomopoulou, K., Batruch, I., Smith, C. R., Soosaipillai, A., Diamandis, E. P., & Hollenberg, M. D. (2010). Functional proteomics of kallikrein-related peptidases in ovarian cancer ascites fluid. *Biological Chemistry*, 391, 381–390.
196. Ahmed, A. S., Dew, T., Lawton, F. G., et al. (2007). Tumour M2-PK as a predictor of surgical outcome in ovarian cancer, a prospective cohort study. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 28, 103–108.
197. Ayhan, A., Ertunc, D., & Tok, E. C. (2005). Expression of the c-Met in advanced epithelial ovarian cancer and its

- prognostic significance. *International Journal of Gynecological Cancer*, 15, 618–623.
198. Tang, M.K., Zhou, H.Y., Yam, J.W., Wong, A.S. c-Met over-expression contributes to the acquired apoptotic resistance of nonadherent ovarian cancer cells through a cross talk mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Neoplasia*, 12, 128–138.
 199. Zhou, H. Y., Pon, Y. L., & Wong, A. S. (2008). HGF/MET signaling in ovarian cancer. *Current Molecular Medicine*, 8, 469–480.
 200. Coffelt, S. B., Marini, F. C., Watson, K., et al. (2009). The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 3806–3811.
 201. Zohny, S. F., & Fayed, S. T. (2010). Clinical utility of circulating matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), CC chemokine ligand 18 (CCL18) and CC chemokine ligand 11 (CCL11) as markers for diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Medical Oncology*, 27, 1246–1253.
 202. Landen, C. N., Kinch, M. S., & Sood, A. K. (2005). EphA2 as a target for ovarian cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 9, 1179–1187.
 203. Lu, C., Shahzad, M. M., Wang, H., et al. (2008). EphA2 over-expression promotes ovarian cancer growth. *Cancer Biology & Therapy*, 7, 1098–1103.
 204. Thaker, P. H., Deavers, M., Celestino, J., et al. (2004). EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10, 5145–5150.
 205. Kobel, M., Kalloger, S. E., Boyd, N., et al. (2008). Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for bio-marker studies. *PLoS Medicine*, 5, e232.
 206. Lim, R., Ahmed, N., Borregaard, N., et al. (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening bio-marker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition. *International Journal of Cancer*, 120, 2426–2434.
 207. Bjorge, L., Hakulinen, J., Vintermyr, O. K., et al. (2005). Ascitic complement system in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 92, 895–905.
 208. Fischer, D. C., Noack, K., Runnebaum, I. B., et al. (2004). Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncology Reports*, 11, 1085–1090.
 209. Surowiak, P., Materna, V., Maciejczyk, A., et al. (2006). CD46 expression is indicative of shorter revival-free survival for ovarian cancer patients. *Anticancer Research*, 26, 4943–4948.
 210. Rousseau, J., Tetu, B., Caron, D., et al. (2002). RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 1544–1549.
 211. Tilli, T. M., Franco, V. F., Robbs, B. K., et al. (2011). Osteopontin-c splicing isoform contributes to ovarian cancer progression. *Molecular Cancer Research*, 9(3), 280–293.
 212. Yan, X. D., & Pan, L. Y. (2006). Proteomic analysis of human ovarian cancer cell lines and their platinum-resistant clones. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 41, 584–587.
 213. Yan, X. D., Pan, L. Y., Yuan, Y., Lang, J. H., & Mao, N. (2007). Identification of platinum-resistance associated proteins through proteomic analysis of human ovarian cancer cells and their platinum-resistant sublines. *Journal of Proteome Research*, 6, 772–780.
 214. Nishimura, S., Tsuda, H., Kataoka, F., et al. (2011). Overexpression of cofilin 1 can predict progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer receiving standard therapy. *Human Pathology*, 42(4), 516–521.
 215. Jones, M. B., Krutzsch, H., Shu, H., et al. (2002). Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics*, 2, 76–84.
 216. Alper, T., Kahraman, H., Cetinkaya, M. B., et al. (2004). Serum leptin and body composition in polycystic ovarian syndrome. *Annals of Saudi Medicine*, 24, 9–12.
 217. Erturk, E., & Tuncel, E. (2003). Polycystic ovarian disease and serum leptin levels? *Fertility and Sterility*, 80, 1068–1069. author reply 9–70.
 218. Qian, B., Katsaros, D., Lu, L., et al. (2011). IGF-II promoter specific methylation and expression in epithelial ovarian cancer and their associations with disease characteristics. *Oncology Reports*, 25, 203–213.
 219. Park, E. K., Johnson, A. R., Yates, D. H., & Thomas, P. S. (2011). Evaluation of ovarian cancer biomarkers in subjects with benign asbestos-related pleural diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49, 147–150.
 220. Bengtsson, S., Krogh, M., Szigyarto, C. A., et al. (2007). Large-scale proteomics analysis of human ovarian cancer for bio-markers. *Journal of Proteome Research*, 6, 1440–1450.

Résumé:

Les cancers de l'ovaire épithéliaux (EOC) sont parmi les affections néoplasiques gynécologiques les plus meurtrières dans les sociétés occidentales. Il n'existe actuellement aucune méthode de dépistage efficace de la maladie dans ses phases précoces de développement. Les travaux de ce doctorat furent articulés autour de deux objectifs relatifs à la recherche de biomarqueurs des EOC. Le premier fût le développement des méthodes d'analyses par spectrométrie de masse MALDI pour le criblage global des marqueurs des différents types d'EOC. Une procédure d'extraction des protéines de hautes masses moléculaires sur coupes de tissus à été créée afin de repousser les limites de sensibilité de la méthode. Ensuite, des analyses multivariées ont permis la comparaison des informations spectrales contenues entre des zones histologiques de natures différentes. Tous ces développements ont conduit à la validation au niveau histopathologique d'un biomarqueur de l'immunosuppression associée au cancer de l'ovaire, le fragment C-terminal de PA28 ou Reg-Alpha. Une autre problématique, la détermination de l'origine des EOC, a également pu être étudiée. Le deuxième objectif fût l'exploration de l'implication relative des différents membres des proprotéines convertases dans les EOC, des enzymes clés dans la maturation de nombreux acteurs moléculaires de la progression tumorale. Pour ce faire, des lignées cellulaires SKOV-3, Knock Down des différents membres de ces enzymes ont été créées pour l'étude de la redondance fonctionnelle de celles-ci. Il a alors été possible de déterminer, *in cellulo* et *in vivo* que PACE4 est particulièrement influente sur la progression du cancer de l'ovaire séreux.

Abstract :

Epithelial ovarian Cancers (EOC) are amongst the most deadly gynecological neoplastic afflictions in western countries. As this time, there is no method for the efficient screening of the disease in its early steps of development. The topics of this PhD are based on two objectives related to biomarkers research of EOC. The first one was the development of analytical methods for MALDI Mass Spectrometry for global biomarkers screenings in different types EOC. An extraction procedure for high molecular mass proteins on tissue sections has been designed in order to push back the limits of sensitivity of the method. Then, multivariate analyses allowed us to compare spectral informations contained in histological regions of different natures. All these developments conducted to the histopathological validation of a biomarker of immunosuppression associated to ovarian cancer, namely the C-terminal fragment of PA28 (Reg-Alpha). Another issue, the determination of EOC origin, has also been studied. The second goal of this PhD has been the exploration of the relative implication of the different members of proproteine convertases (PCs) in EOC, which are keys enzymes involved in the maturation of many molecular actors of tumoral progression. To do so, SKOV-3 cell lines have been knocked-down for different PCs to study the functional redundancy of these enzymes. It has then been possible to determine, *in cellulo* and *in vivo*, that PACE4 is particularly influent on ovarian cancer progression.

Mots clés:

Cancer de l'ovaire, Spectrométrie de masse, Imagerie MALDI, Histopathologie, Biomarqueurs, Protéomique, Proprotéines convertases, SKOV-3, Culture cellulaire, Knock Down.

**Laboratoire de Spectrométrie de
Masse Biologique Fondamentale et
Appliquée
IFR 147, Bât SN3
Université de Lille 1
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex
France**

**Institut de Pharmacologie de Sherbrooke
Université de Sherbrooke
Faculté de Médecine et des Sciences de la
Santé
3001, 12ème Avenue Nord.
Sherbrooke, Québec, J1H 5N4
Canada**

