HAL
open science

Approches protéomiques pour l'analyse des exosomes de liquides biologiques pour la recherche de biomarqueurs

Matthieu Bourderioux

To cite this version:

Matthieu Bourderioux. Approches protéomiques pour l'analyse des exosomes de liquides biologiques pour la recherche de biomarqueurs. Physiologie [q-bio.TO]. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB102 . tel-01535959

HAL Id: tel-01535959

https://theses.hal.science/tel-01535959v1

Submitted on 9 Jun 2017

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

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

Université Paris Descartes
Ecole doctorale BioSPC

Thèse de Doctorat

Pour l'obtention du diplôme de docteur de l'Université Paris Descartes

Spécialité Physiologie, Physiopathologie

Présentée par

Matthieu Bourderioux

Soutenue publiquement le :

5 Octobre 2015

Approches protéomiques pour l'analyse des exosomes de liquides biologiques pour la recherche de biomarqueurs

Dr. MARIN Philippe	Rapporteur
Dr. SCHANSTRA Joost	Rapporteur
Dr. ALBIGES Laurence	Examinateur
Pr. KNEBELMANN Bertrand	Examinateur
Dr. GUERRERA Chiara	Examinateur
Dr EDELMAN Aleksander	Directeur de Thèse

La simplicité est la sophistication suprême.

Léonard de Vinci

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser un très grand MERCI à Aleksander et Chiara, qui m'ont proposé de continuer l'aventure après mon stage de master 2, et que je ne regrette absolument pas aujourd'hui.

Je tiens ensuite à remercier Messieurs Marin et Schanstra pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leurs suggestions. Je remercie également les professeurs Albiges et Knebelmann d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci à vous Bertrand pour votre participation à cette étude sur la cystinurie. Merci également à Estelle et Bernard Escudier, pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée pendant mes 4années au sein du labo.

A l'ensemble du labo Edelman/Sermet, pour leur accueil, leurs conseils, et tous ces bons moments passés ensemble.

A Danielle qui m'a appris « à la dure » le fonctionnement du laboratoire, mais le jeu en valait la chandelle, et puis on s'est bien marré !

A Cérina, merci pour tout ce temps passé à entretenir les spectro, je pense qu'on en aurait pas fait autant sans toi. Sans parler des comptes rendus de séries épiques !

A Thao, toujours disponible pour corriger les présentations et posters, même au dernier moment, sans parler de ton aide précieuse au moment de la rédaction de mon manuscrit. Un grand merci à toi aussi.

Impossible de ne pas remercier mon Papa, qui, je pense, est responsable de mon goût pour les sciences. Je me souviendrai toujours de ces fois où, au restaurant, je te posais une question de mathématiques, et que tu demandais un stylo à maman afin de griffonner un schéma sur un coin de serviette en papier.

A mes sœurs qui ont toujours supporté leur « petit » frère, soit parce qu'il en avait besoin, soit parce qu'il était pénible. Et puis les week-ends chez elles à la campagne permettaient de bien se changer les idées entre deux manipes. Un merci à mes beaufs aussi, pour m'avoir changé les idées, donné des conseils et soutenu également pendant ces moments.

A Catherine et Gilbert, qui m'ont également soutenu pendant toute cette période et les moments difficiles.

Aux copains des autres équipes, les déjeuners avec des discussions Disney enflammées et les bêtises racontées dans les couloirs au détour d'une manipe urgente me manqueront.

A mes amis, qui ne comprennent toujours pas ce que je fais dans la vie mais qui font semblant de comprendre à chaque fois, merci à vous aussi pour tous ces bons moments depuis toutes ces années.

A toi Margot, je ne pourrais jamais mettre des mots suffisant pour te remercier de ton soutient dans les moments où le travail prenait beaucoup de mon temps, mais également pendant les moments de doute, et pour la suite qui nous attend tous les deux !

Grosse pensée également pour ceux qui auraient dû être présents en ce jour particulier mais pour lesquels les évènements ou la Nature en ont décidé autrement.

De manière globale, cette thèse est dédicacée à :

- Margot qui a accepté de se lever de nombreuses fois le matin pour uriner dans des pots (y sont fous ces chercheurs).
- Mais également à tous les témoins de mon étude qui ont subi le même traitement, nous permettant de publier nos travaux ☺.
- A la spectrométrie de masse, qui déchire !

Cette thèse n'est pas dédicacée :

- Aux protéines, qui n'en font qu'à leur tête et rarement la mienne.
- Aux joints d'ultracentrifugeuse, qui ne cassent que lorsque l'échantillon provient d'un patient.

D'une façon générale cette thèse est dédicacée à l'ensemble des personnes avec qui j'ai pu interagir pendant ces quatre années, avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants.

Résumé

Un biomarqueur est une molécule (ou un ensemble de molécules) présente dans l'organisme qui témoigne de l'apparition d'un processus pathologique. Il permet ainsi de dépister une maladie, d'en prédire sa gravité ou encore d'évaluer l'efficacité d'un traitement. Les liquides biologiques représentent des milieux de choix pour la recherche de biomarqueurs en pathologie humaine car leur collection est habituelle dans la prise en charge des patients et moins invasive comparée aux biopsies d'organes ou de tissus.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux exosomes présents dans ces liquides biologiques. Les exosomes sont des nanovésicules dont le diamètre est compris entre 30 et 100 nanomètres. Ils sont sécrétés par tous les types cellulaires et contiennent des protéines cytoplasmiques et membranaires spécifiques de leur cellule d'origine. L'intérêt majeur des exosomes isolés à partir des liquides biologiques, est qu'ils constituent une source de biomarqueurs. Ils peuvent donc être assimilés à une « biopsie liquide ». L'analyse des exosomes pourrait compléter utilement des examens classiques de dépistage, de diagnostic et de suivi d'une pathologie.

Dans le cadre de projet de cette thèse, nous avons appliqué des techniques de protéomique à haut débit pour l'analyse des exosomes. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'analyse du profil protéique des exosomes urinaires dans le contexte de deux pathologies du tractus urinaire : la cystinurie et le cancer du rein. La cystinurie est une néphropathie lithiasique d'origine génétique pour laquelle il y a peu de marqueurs biologiques pouvant prédire son évolution vers l'insuffisance rénale terminale. Nous avons développé une méthode de préparation des exosomes urinaire permettant d'analyser de façon reproductible leurs profils protéiques. Nous avons appliqué cette méthode à huit patients cystinuriques et comparé les résultats aux profils obtenus chez dix sujets sains. Un panel de 38 protéines différentiellement exprimé dans les exosomes des patients a été identifié et en partie validé par Western blot. Concernant le cancer du rein à cellules claires pour lequel le diagnostic nécessite des prélèvements invasifs par biopsie, nous avons analysé les exosomes urinaires de huit patients avant et après néphrectomie. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un panel de 25 protéines surexprimées dans les exosomes des patients. Enfin, le dernier volet de cette thèse a été consacré à l'analyse des exosomes du lavage broncho-alvéolaire provenant de patients MV, maladie d'origine génétique qui atteint principalement les poumons. L'analyse des exosomes de lavage broncho-alvéolaire pourrait permettre de donner un éclairage nouveau sur la physiopathologie de la maladie. Nous avons réalisé la comparaison des profils protéiques des exosomes de quatre patients MV, et six patients asthmatiques.

L’ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse montre que l’analyse protéomique des exosomes issus de fluides biologiques peut aider la recherche de biomarqueurs diagnostics ou pronostics de maladies.

Table des matières

Remerciements 3

Résumé 5

Table des matières 7

Liste des figures et tableaux 11

Abréviations 13

Introduction 14

1 Exosomes: généralités 14

1.1 Définition 14

1.2 Historique 16

1.3 Compositions biochimique des exosomes 20

1.4 Biogénèse et réintégration des exosomes 21

1.4.1 Formation des corps multivésiculaires selon un mécanisme dépendant du complexe ESCRT. 22

1.4.2 Fusion avec la membrane et sécrétion des exosomes 23

1.4.3 Réintégration des exosomes et communication intercellulaire 24

1.5 Rôle des exosomes 25

1.5.1 Rôle des exosomes dans l'immunité 25

1.5.2 Rôle des exosomes dans la communication intercellulaire 27

1.5.3 Exosomes comme réservoir de biomarqueur 29

2 Approches protéomiques pour la recherche et la validation de biomarqueurs dans les liquides biologiques 31

2.1 Définition et évolution du concept de biomarqueur 31

2.2 Approches protéomiques dans la recherche de biomarqueurs.....33

2.2.1 Protéomique dans la phase de découverte des biomarqueurs.....35

2.2.2 Protéomique en phase de validation des biomarqueurs.....47

2.3 Composition des liquides biologiques.....53

2.3.1 Le sang.....53

2.3.2 Les urines.....55

2.3.3 Lavage Broncho-alvéolaire.....56

2.4 Protéomique des liquides biologiques.....57

2.4.1 Sérum/plasma.....57

2.4.2 Urines.....61

2.4.3 Protéomique du lavage broncho-alvéolaire.....66

2.5 Avantages et limites de la protéomique dans la recherche de biomarqueurs....67

3 Exosomes des liquides biologiques.....71

3.1 Intérêt des exosomes par rapport au liquide biologique.....71

3.2 Isolement des exosomes.....73

3.2.1 Isolement des exosomes à partir du sérum/plasma.....73

3.2.2 Isolement des exosomes urinaires.....74

3.2.3 Isolement des exosomes à partir du LBA.....76

3.3 Protéomique des exosomes.....76

3.3.1 Protéomique des exosomes du sérum/plasma pour la recherche des biomarqueurs.....77

3.3.2 Analyse protéomique des exosomes urinaires pour la recherche de biomarqueurs.....79

4 Maladies étudiées.....84

4.1 Maladies rénales 84
4.1.1 Cystinurie 84
4.1.2 Cancer du rein 87
4.2 La mucoviscidose 91
4.2.1 Description 91
4.2.2 Etudes protéomiques de la mucoviscidose 92
Objectifs 95
Méthodes 96
1 Population des études et collection des échantillons 96
1.1 Cystinurie 96
1.2 Cancer du rein 96
1.3 Recueil des lavages broncho-alvéolaires 97
2 Préparation des exosomes 97
2.1 Exosomes urinaires 97
2.2 Exosomes respiratoires 98
3 Analyse protéomique et analyse bio-informatique 99
3.1 Cystinurie 99
3.1.1 Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse 99
3.1.2 Analyse protéomique 99
3.1.3 Analyse bio-informatique 100
3.2 Cancer du rein 101
3.2.1 Analyse protéomique 101
3.2.2 Analyse bio-informatique 101
3.3 Mucoviscidose 103

3.3.1 Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse 103

3.3.2 Analyse par spectrométrie de masse 103

3.3.3 Analyse bio-informatique 104

4 Microscopie électronique 105

5 Lipides 105

6 SDS-PAGE 106

Résultats 107

Article 1: “New Workflow for Proteomic Analysis of Urinary Exosomes and Assessment in Cystinuria Patients” 107

Article 2: “Potential renal cancer diagnostic biomarkers by proteomics approach” 108

Article 3: “Comparative proteomics of respiratory exosomes of cystic fibrosis patients” 132

Discussion et perspectives 161

1 Les exosomes sont-ils une bonne source de biomarqueurs ? 161

2 Protéomique pour la recherche de biomarqueurs 164

3 Méthodologie des études cliniques 166

4 Perspectives 169

4.1 Cystinurie 169

4.2 Cancers à cellules claires 170

4.3 La mucoviscidose 171

Bibliographie 172

Annexe 216

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : représentation schématiques des différents types de vésicules secrétées depuis la membrane plasmique, ou issues de compartiments endocytiques (Colombo, Raposo, et Théry, 2014).....16

Figure 2 : Historique des différentes évolutions qu'a connu le champ de recherche sur les exosomes, depuis leur première description en 1981 jusqu'à aujourd'hui. 19

Figure 3 : Histogramme représentant le nombre d'études publiées par année qui répondent au mot clé « exosome ». 20

Figure 4 : Représentation schématique de la composition typique d'un exosome, basé sur les données de quinze études protéomique sur des exosomes isolés de cellules en culture et liquides biologiques.....21

Figure 5 : Schéma représentant la machinerie chargée du tri des protéines à destination des exosomes, via ESCRT (Williams et Urbé, 2007). 22

Figure 6 : Schéma résumant les principales découvertes concernant les exosomes issus de cellules du système immunitaire et leur capacité à active d'autres cellules pour amplifier ou déclencher la réponse immunitaire (Théry, Ostrowski, et Segura, 2009). 27

Figure 7 : Biogenèse des exosomes et leur interaction avec des cellules cibles. 29

Figure 8 : Schéma représentant les phases de découverte et de validation de biomarqueurs par l'analyse protéomique (Rifai, Gillette, et Carr, 2006). 35

Figure 9 : Schéma représentant les deux types d'analyses protéomique possibles lors d'une phase de découverte de biomarqueurs (Veenstra et al., 2005). 36

Figure 10 : Comparaison des méthodes d'analyse des protéines par protéomique à haut débit ou par protéomique ciblée 48

Figure 11 : Schéma d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle utilisé lors d'analyse SRM/MRM.....50

Figure 12 : Représentation schématique des analyses par PRM réalisées sur LTQ-Orbitrap ou Q-TOF. 50

Figure 13 : Représentation schématique d'une analyse DIA sur une fenêtre de 20 m/z. .52

Figure 14 : Représentation schématique d'une analyse DIA réalisée sur LTQ-Orbitrap. Adapté de http://www.biognosys.ch/technology/hrm.html. 53

Figure 15 : Schéma du transporteur de la cystine localisé dans le tubule proximal rénal. 85

Figure 16 : Tumor Node Metastasis (TNM) classification pour le cancer du rein (Jonasch, Gao, et Rathmell, 2014) 89

Figure 17 : Tests préliminaires de dosage en PRM (jaune) ou DIA (bleu) de peptides lourds issus de 4 protéines d'intérêts surexprimées dans les exosomes de patients cystinuriques.....216

Tableau 1 : Liste des caractéristiques principales des différents types de vésicules issues de cellules.....15

Tableau 2 : Tableau de comparaisons des spécifications des différents analyseurs de masse.....42

Tableau 3: Tableau récapitulatif des publications scientifiques sur la protéomique du sérum et plasma.....61

Tableau 4: Tableau récapitulatif des publications scientifiques sur la protéomique des urines.....65

Tableau 5: Tableau récapitulatif des publications scientifiques sur la protéomique du lavage broncho-alvéolaire.....66

Tableau 6 : Résumé des études de protéomique différentielle des exosomes urinaires dans des cas pathologiques Adapté de (Dear, Street, et Bailey, 2012).....83

Abréviations

ACN	Acetonitrile
ARN	Acide ribonucléique
CE	Capillary Electrophoresis
CID	Collision Induced Dissociation
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
Da	Dalton
DDA	Data dependent anakysis
DIA	Data independent analysis
eGFR	estimated Glomerular Filtration Rate
ESCRT	Endosomal Sorting Complex required for transport
ESI	Electrospray Ionization
FDR	False Discovery Rate
FT-ICR	Fourier Transfomed - Ion Cyclotron Resonance
GNRP	Glomérulonéphrite Rapidement Progressive
IEF	IsoElectroFocalisation
IT	Ion trap
iTRAQ	isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
LBA	Lavage Bronchoalvéolaire
LFQ	Label-Free Quantification
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
LTQ	Linear Trap Quadrupole
m/z	Rapport masse sur charge
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MV	Mucoviscidose
MVB	Multivesicular body
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
ppm	partie par million
PRM	Parallel Reaction Monitoring
Q	Quadripôle
RCC	Renal Cell Carcinoma
ROC	Receiver Operating Characteristic
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SELDI	Surface Enhanced Laser Desorption Ionization
SRM/MRM	Single/Multiple Reaction Monitoring
TFA	Acide Trifluoroacétique
THP	Tamm-Horsfall Protein
TOF	Time-Of-Flight
TQ/QQQ	Triple Quadripôle
XIC	Extracted Ion Chromatogram

Introduction

1 Exosomes: généralités

1.1 Définition

Toutes les cellules de l'organisme sont capables de libérer dans le milieu extracellulaire des vésicules, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques (Dear, Street, et Bailey, 2012). Plusieurs types de vésicules sont décrits. Parmi les caractéristiques communes, les vésicules sont globalement rondes, délimitées par une bicouche lipidique comparable à celle de la membrane plasmique et contiennent des protéines solubles et membranaires. Elles se différencient par leur taille, densité, composition en lipides et en protéines, selon le mécanisme de leur biogenèse. C'est pourquoi le terme de « microparticules » qui englobe tous les types de vésicules, est souvent utilisé dans la littérature pour les décrire, quand une caractérisation précise de leur origine n'a pas été réalisée (Dear, Street, et Bailey, 2012). En effet, l'étude du mécanisme de leur biogenèse et de leurs caractéristiques physicochimiques, a permis d'identifier plusieurs types de vésicules (Théry, Ostrowski, et Segura, 2009) (Tableau 1,).

Les exosomes (Dear, Street, et Bailey, 2012) représentent un type spécifique de vésicules issues de la voie endosomale dans les cellules eucaryotes. Au cours du processus de maturation des endosomes en endosomes tardifs ou corps multivésiculaires (multivesicular bodies, MVB), la membrane des endosomes subit une invagination formant des nanovésicules dans la lumière des endosomes (ainsi appelées vésicules intraluminales). Les MVB fusionnent ensuite avec des lysosomes pour permettre un processus intracellulaire de dégradation des protéines. Mais la membrane des MVB peut aussi fusionner avec la membrane plasmique et conduire ainsi à la libération extracellulaire des vésicules intraluminales qui sont alors appelées exosomes.

Les exosomes sont caractérisés par des critères en microscopie électronique où ils apparaissent concaves avec une taille comprise entre 20 et 100 nm. Du point de vue physico-chimique, ils ont une densité en gradient de sucrose comprise entre 1,10 et 1,19 g/mL et ils contiennent des protéines et lipides spécifiques de leur voie de biogenèse.

Outre les exosomes, d'autres vésicules sont décrites (Tableau 1) :

- Les microvésicules constituent un groupe très varié de vésicules issues de la membrane plasmique. Ce groupe englobe toutes les vésicules dont la taille dépasse 100 nm, ce qui permet leur séparation par centrifugation à basse vitesse (Heijnen et al., 1999).

- Les particules membranaires sont comparables aux exosomes. Cependant, elles se différencient par leur densité ou encore par l'absence de marqueur membranaire comme la protéine CD63 (Marzesco et al., 2005).

- Les ELV (Exosome-like vesicles) ont été décrites lors de l'étude de la sécrétion du récepteur au TNF (Tumor Necrosis Factor). Ces vésicules ont également des caractéristiques qui les rapprochent des exosomes. Cependant, elles ne présentent pas les marqueurs exosomaux LAMP-1 et LAMP-2 (Hawari et al., 2004).

- Les vésicules apoptotiques sont quant à elles un type de vésicules très hétérogènes avec des caractéristiques très différentes des exosomes, que ce soit d'un point de vue morphologique ou biochimique (Théry et al., 2001).

- Les ectosomes sont directement issus du bourgeonnement de la membrane plasmique. Ils ont été initialement isolés à partir de polynucléaires neutrophiles stimulés. Aujourd'hui, les ectosomes représentent les microvésicules issues de la membrane plasmique ayant un diamètre compris entre 50 et 200 nm (Gasser et al., 2003).

Feature*	Exosomes	Microvesicles	Ectosomes	Membrane particles	Exosome-like vesicles	Apoptotic vesicles
Size	50–100 nm	100–1,000 nm	50–200 nm	50–80 nm	20–50 nm	50–500 nm
Density in sucrose	1.13–1.19 g/ml	ND	ND	1.04–1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16–1.28 g/ml
Appearance by electron microscopy‡	Cup shape	Irregular shape and electron-dense	Bilamellar round structures	Round	Irregular shape	Heterogeneous
Sedimentation	100,000 g	10,000 g	160,000–200,000 g	100,000–200,000 g	175,000 g	1,200g , 10,000 g or 100,000 g
Lipid composition	Enriched in cholesterol, sphingomyelin and ceramide; contain lipid rafts; expose phosphatidylserine	Expose phosphatidylserine	Enriched in cholesterol and diacylglycerol; expose phosphatidylserine	ND	Do not contain lipid rafts	ND
Main protein markers	Tetraspanins (CD63, CD9), Alix and TSG101	Integrins, selectins and CD40 ligand	CR1 and proteolytic enzymes; no CD63	CD133; no CD63	TNFRI	Histones
Intracellular origin	Internal compartments (endosomes)	Plasma membrane	Plasma membrane	Plasma membrane	Internal compartments?	ND

Tableau 1 : Liste des caractéristiques principales des différents types de vésicules issues de cellules
nm, nanomètres. ND, non déterminé. TSG101, tumour susceptibility gene 101. CR1, complement component receptor 1. TNFR1, tumour necrosis factor receptor 1 (Colombo, Raposo, et Théry, 2014).

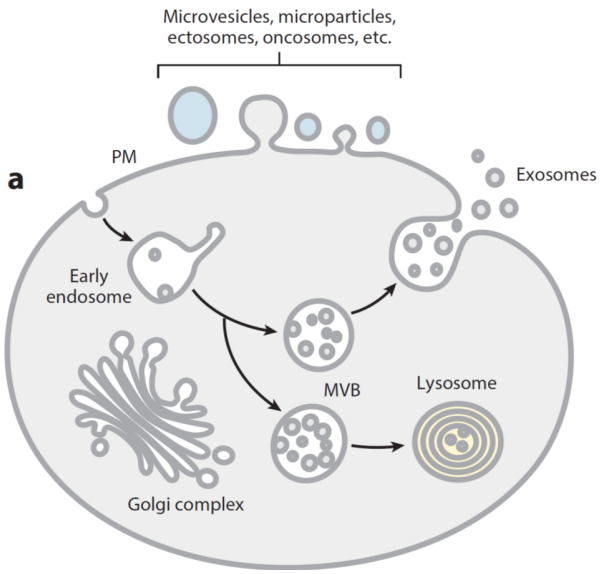


Figure 1 : représentation schématiques des différents types de vésicules secrétées depuis la membrane plasmique, ou issues de compartiments endocytiques (Colombo, Raposo, et Théry, 2014).

1.2 Historique

C'est en 1981 que l'équipe de Heine (Trams et al., 1981) décrit pour la première fois des vésicules exfoliées à partir de trois lignées cellulaires (neuroblastome de souris, gliome de rat ou mélanome de souris) et deux types de cultures primaires (aorte de rat ou astroblaste de souris).

Les membranes isolées étaient significativement enrichies en sphyngomyéline et en acides gras polyinsaturés, ce qui a permis aux auteurs de conclure à l'origine plasmique des vésicules. L'analyse de ces vésicules en microscopie électronique révéla la présence de 2 ensembles de vésicules : celles de diamètre compris entre 500 et 1000 nm et celles de diamètre plus faible de l'ordre de 40 nm. Déjà, à l'époque, les auteurs faisaient l'hypothèse que ces vésicules pouvaient avoir une fonction physiologique parce qu'elles avaient une activité 5'-nucléotidase. Trams et coll. (1981)proposèrent alors de nommer ces vésicules « exosomes », à ce moment sans qu'aucun lien ne soit établi avec leur origine endosomale.

Deux ans plus tard, deux groupes de recherche totalement indépendants (Harding et Stahl, 1983 ; Pan et Johnstone, 1983), ont publié des travaux qui ont établi les bases fondamentales pour la compréhension de la biogenèse des exosomes et de leur éventuel rôle physiologique. Ces deux groupes ont étudié le devenir du récepteur à la transferrine des réticulocytes respectivement, de mouton (Harding and Stahl 1983) et de rat (Pan and Johnstone 1983). Le premier groupe a réalisé plusieurs expériences en marquant la transferrine à l'or colloïdal, notamment par l'incubation des réticulocytes pendant 20 minutes avec de la transferrine marquée (Harding et Stahl, 1983). Les auteurs ont observé en microscopie électronique, que l'endocytose de la transferrine débute au sein des MVB et conduit à la libération de la transferrine dans des nanovésicules. Ils ont suggéré alors que ces nanovésicules pourraient être des vestiges de l'exocytose d'un MVB. Le deuxième groupe a montré que le fait de mettre en culture des réticulocytes avait pour conséquence de leur faire perdre le récepteur de la transferrine *via* des vésicules (Pan et Johnstone, 1983). En effet, le marquage par de l'isothiocyanate de fluorescéine du récepteur à la transferrine des réticulocytes a conduit à l'apparition d'une fluorescence dans le milieu de culture. Les auteurs ont postulé alors que les MVE seraient responsables du mécanisme cellulaire permettant l'élimination du récepteur. Dans ce travail, les auteurs ont isolé pour la première fois ces nanovésicules par une méthode d'ultracentrifugation à 100 000 g, pour les observer en microscopie électronique et analyser leur contenu en protéines par électrophorèse bidimensionnelle SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis).

En 1986, Kassis et coll. (1986) ont montré que les exosomes régulaient l'adénylate cyclase. En effet, les exosomes issus de cellules C6 de gliome de rat contiennent à la fois des composants activateurs et inhibiteurs de l'adénylate cyclase, sans pour autant porter d'activité adénylate cyclase. Il s'agit là de la première étude démontrant un rôle physiologique des exosomes in vitro.

En 1987, Johnstone et coll. (1987)ont proposé un mécanisme général de biogenèse des exosomes : l'endocytose de protéines membranaires spécifiques, suivie de la formation des MVB, puis la fusion de leur membrane avec la membrane plasmique et enfin la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire. Cependant, plusieurs points restent encore obscurs

concernant notamment les types cellulaires et leur état (en cours de maturation par exemple) à l'origine de la formation des vésicules.

Au début des années 90, les travaux concernant les exosomes se concentrent sur la démonstration de leur rôle dans le renouvèlement des membranes plasmiques, supposée permettre à la cellule de se débarrasser des protéines non fonctionnelles. Les auteurs ont proposé que le rôle principal des exosomes serait de permettre à des cellules ayant de faibles capacités de dégradation ou faisant face à un système d'élimination (tel que les reins ou les intestins), de se séparer des protéines dénaturées, plus fonctionnelles pour la cellule (Vingtdeux, Sergeant, et Buée, 2012).

Il faudra attendre la deuxième moitié des années 90 pour que Raposo et coll. (1996) fassent la démonstration d'un autre rôle des exosomes, dans la communication intercellulaire et en particulier dans la réponse immunitaire.

En effet, il était connu à cette époque que la majorité des CMH II étaient situés dans les Lymphocytes B (LB) dans des compartiments spécifiques (MIICs). Or ces MIICs sont localisés dans les compartiments endocytiques tardifs et possèdent les marqueurs lysosomaux LAMP1, CD63, 3-hexosaminidase et cathepsine D. Leur fusion avec la membrane plasmique libère des vésicules présentes dans la lumière des MIICs. Ces vésicules présentent les caractéristiques des exosomes en microscopie électronique. De plus, les auteurs observent ainsi que ces exosomes issus de LB activés, sont capables de stimuler des lymphocytes T (LT) et ce, de manière peptide spécifique (Raposo et al., 1996).

Le même groupe a publié 2 ans plus tard, une étude suggérant pour la première fois un rôle thérapeutique de ces nanovésicules, montrant que des exosomes isolés à partir de cellules dendritiques de moelle osseuse et activées avec un peptide tumoral, joueraient un rôle dans l'inhibition de la croissance tumorale (Zitvogel et al., 1998).

Depuis ces travaux et grâce à l'amélioration des connaissances sur la composition biochimique des exosomes, il a été rapporté que de nombreux types cellulaires sont capables de sécréter des exosomes, comme par exemple les cellules épithéliales intestinales (van Niel et al.,

2001), les cellules neuronales (Fauré et al., 2006), les cellules de Schwann (Fevrier et al., 2004). Les exosomes ainsi secrétés par les différentes cellules de l'organisme sont détectés dans tous les liquides biologiques tels que le sang (Caby et al., 2005), l'urine (Pisitkun, Shen, et Knepper, 2004), la salive (Ogawa et al., 2011), le lait maternel (Admyre et al., 2007), le sperme (Ronquist et Brody, 1985) ou encore le liquide amniotique (Asea et al., 2008).

Afin de mieux comprendre leur rôle biologique et leur potentiel comme réservoir de biomarqueurs, l'intérêt pour les exosomes a explosé dans la dernière quinzaine d'années, ce qui se traduit par une augmentation considérable du nombre de publications à leur sujet (Figure 3).

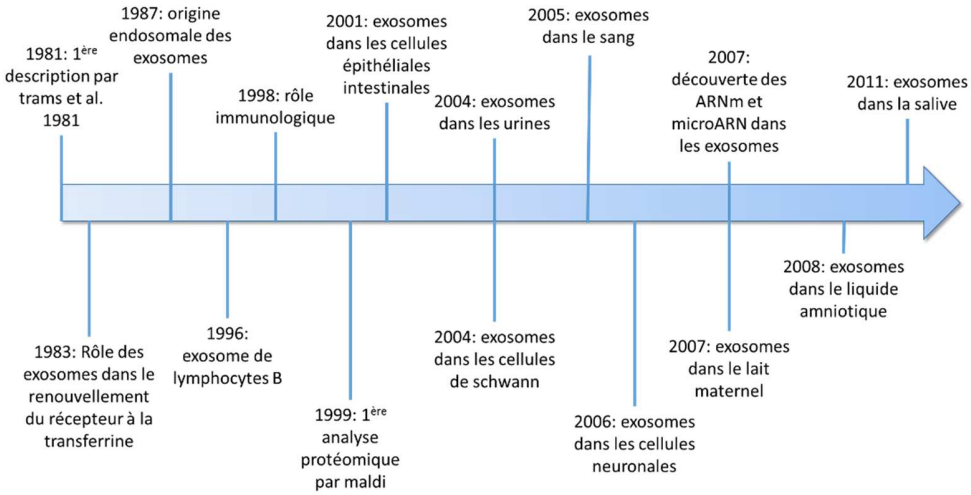


Figure 2 : Historique des différentes évolutions qu'a connu le champ de recherche sur les exosomes, depuis leur première description en 1981 jusqu'à aujourd'hui.

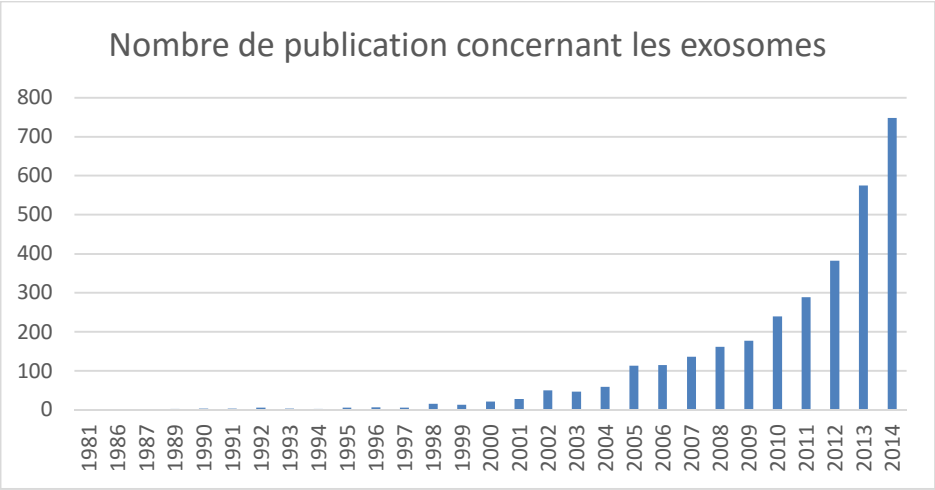


Figure 3 : Histogramme représentant le nombre d'études publiées par année qui répondent au mot clé « exosome ». http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=exosome.

1.3 Compositions biochimique des exosomes

Depuis quinze ans, un gros effort a été fourni pour la caractérisation biochimique des exosomes et de leur contenu. Un grand pas dans l'analyse des exosomes a été réalisé en 1999 (Théry et al., 1999) grâce à la première analyse du contenu protéique des exosomes par la spectrométrie de masse (MS) de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight). Onze protéines sélectivement enrichies dans les exosomes issus de cellules dendritiques ont pu être identifiées, dont les protéines CD9, annexine A2 et HSPA8 qui jouent un rôle dans la biogenèse des exosomes et des protéines CMH II ou la chaîne alpha de l'intégrine Mac-1 qui sont associées à la membrane plasmique.

Plus récemment, en 2007, l'analyse des exosomes issus de différents types cellulaires et de différents liquides biologiques, a mis en évidence la présence d'acides nucléiques : des ARNm (Acides ribonucléiques messagers) et des micro-ARN (Valadi et al., 2007). Aussi, par l'utilisation des techniques de microarray et de marquages radioactifs, Valadi et coll. ont pu observer que les exosomes étaient capables de transférer leur contenu à d'autres cellules adjacentes en culture. De plus, les auteurs ont montré que ces ARNm étaient fonctionnels puisqu'ils pouvaient être traduits en protéines dans les cellules réceptrices. La présence d'ARNm au sein des exosomes a été par la suite validée par plusieurs groupes travaillant sur les exosomes issus de tumeurs et de

cellules souches (Baj-Krzyworzeka et al., 2006 ; Skog et al., 2008). La présence de micro-ARN dans les exosomes a été observée dans des vésicules extracellulaires issues de glioblastome et de cellules sanguines (Hunter et al., 2008 ; Skog et al., 2008). Depuis, l'intérêt pour les exosomes et les autres vésicules extracellulaires dans le transfert de matériel génétique, n'a cessé de croître. Dernièrement en 2012, il a été mis en évidence la présence dans les exosomes d'ARN non codant pourvus de capacité de régulation sur le génome des cellules cibles (Nolte-'t Hoen et al., 2012).

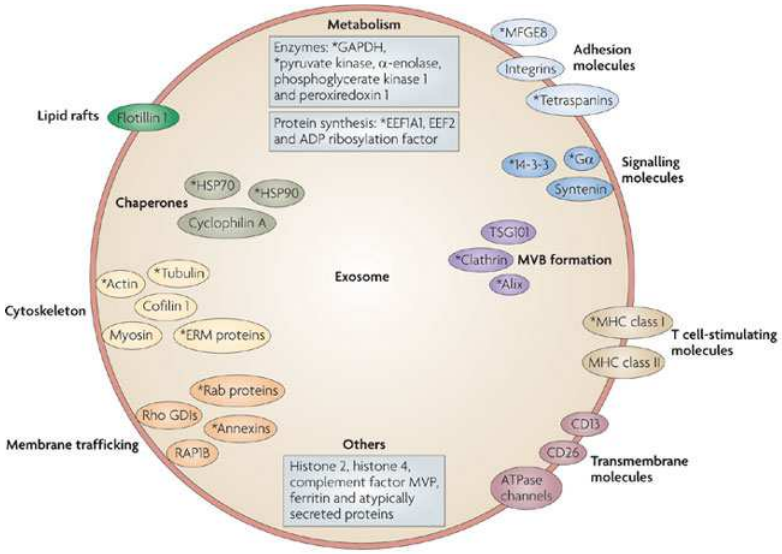


Figure 4 : Représentation schématique de la composition typique d'un exosome, basé sur les données de quinze études protéomique sur des exosomes isolés de cellules en culture et liquides biologiques.
Les protéines identifies dans au moins 30% des études sont listées ici, et celles identifiées dans au moins 50% sont indiquées avec un astérisque. EEF, eukaryotic translation elongation factor; ERM, ezrin, radixin and moesin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-activating protein; HSP, heat shock protein; MFGE8, milk fat globule EGF factor 8 protein; MVB, multivesicular body; MVP, major vault protein; RAP1B, RAS related protein 1B; Rho GDI, Rho GDP dissociation inhibitor; TSG101, tumour susceptibility gene 101 (Théry, Ostrowski, et Segura, 2009).

1.4 Biogénèse et réintégration des exosomes

La biogenèse des exosomes se déroule en 3 grandes étapes. La première est la maturation d'un endosome précoce en MVB. La membrane des MVB va subir des invaginations et conduire à la formation de vésicules intraluminales. La membrane des MVB fusionne ensuite avec la membrane plasmique, libérant ainsi les vésicules intraluminales ou exosomes, dans le milieu extracellulaire.

1.4.1 Formation des corps multivésiculaires selon un mécanisme dépendant du complexe ESCRT.

Le mécanisme pour la formation des MVB et exosomes ferait intervenir le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Le système ESCRT est composé de 30 protéines qui se répartissent en 4 grands ensembles (ESCRT-0, -I, -II et –III) et a été étudié en profondeur chez la levure (Hanson et Cashikar, 2012).

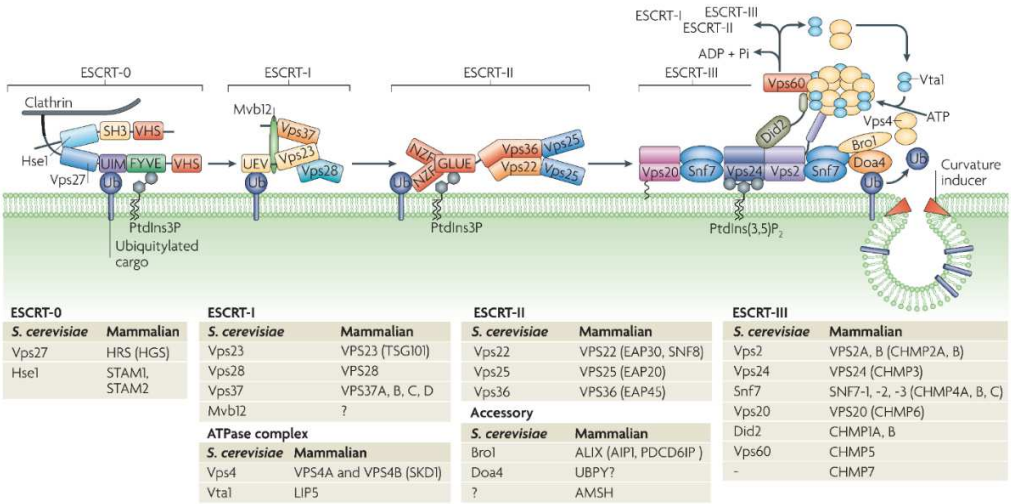


Figure 5 : Schéma représentant la machinerie chargée du tri des protéines à destination des exosomes, via ESCRT (Williams et Urbé, 2007).

ESCRT-0 sélectionne les protéines qui seront incluses dans les exosomes grâce à la présence de cinq motifs de liaison aux ubiquitines. Le cargo ubiquitinylé est séquestré dans des domaines membranaires tapissés par des clathrines. ESCRT-0, par son domaine PSAP, va interagir avec la protéine TSG101 afin de recruter ESCRT-0 (Bache et al., 2003 ; Katzmann et al., 2003). Ceci conduit à diriger les protéines du cargo vers les MVB.

ESCRT-I est essentiel au tri du cargo protéique (Katzmann, Babst, et Emr, 2001) et à la création des vésicules intraluminales. ESCRT-I recrute ESCRT-II et ils agissent ensemble afin de créer et stabiliser un bourgeonnement dans le MVB (Wollert et Hurley, 2010). ESCRT-II est un hétérotétramère qui interagit d'une part avec ESCRT-I, et d'autre part avec ESCRT-III. ESCRT-III joue un rôle dans la constriction membranaire et la scission de la vésicule. Il n'est composé que de protéines solubles qui polymérisent en filaments quand elles sont recrutées à la membrane et

activées (Babst et al., 2002 ; Teis et al., 2010). Chez la levure, chacune des sous-unités VPS25 de ESCRT-II se lie à la sous-unité VPS20 de ESCRT-III (Teis et al., 2010). VPS20 aurait alors la capacité de polymériser la protéine SNF7 dans ESCRT-III, qui à son tour, recruterait VPS2 et VPS24 qui limiteraient cette polymérisation.

Selon le schéma actuel, après scission de la vésicule, la protéine VPS4, appelée « protéine associée à ESCRT-III », va permettre de désassembler ESCRT-III en faisant passer chacune de ces sous-unités par son pore central afin d'en réaliser le dépliement partiel ou complet.

Pour finir, la dé-ubiquitinylation du cargo protéique est essentielle pour son incorporation au sein des exosomes. Chez les mammifères, la protéine UBPY est le principal candidat pour ce rôle (Kato, Miyazawa, et Kitamura, 2000).

Il est intéressant de noter que l'inactivation concomitante des protéines des 4 complexes ESCRT n'empêche pas la formation des MVB et des exosomes (Stuffers et al., 2009). Il pourrait donc exister une ou des voies parallèles à celle du complexe ESCRT pour la formation et la composition du contenu en protéines des exosomes.

1.4.2 Fusion avec la membrane et sécrétion des exosomes

Les protéines SNAP (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein) forment des complexes avec les protéines SNARE (SNAP REceptors) entre deux membranes et régulent leur fusion entre deux organelles. Il a été montré que la régulation calcium-dépendante de la fusion des lysosomes sécrétoires avec la membrane plasmique implique la protéine SNAP-23 (à la membrane plasmique) et VAMP8 (Vesicle-essociated membrane protein) dans les lysosomes de mastocytes (Puri et Roche, 2008), VAMP7 dans des cellules épithéliales (Rao et al., 2004) ou les neutrophiles (Logan et al., 2006), mais l'implication des SNARE dans la fusion de la membrane des MVB avec la membrane plasmique pour libérer les exosomes n'a que très peu été étudiée. Il a été montré que VAMP7 favorise l'exocytose des MVB pour libérer des vésicules extracellulaires dans la lignée cellulaire K562. A l'inverse, son inhibition dans des cellules MDCK (Proux-Gillardeaux et al., 2007) ou dans des cellules épithéliales (Rao et al., 2004) diminue la

sécrétion lysosomale mais pas la sécrétion de vésicules possédant le marqueur exosomal HSP70. La protéine Ykt6, une SNARE impliquée dans le transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, a été observée dans les MVB et elle est nécessaire dans la sécrétion d'exosomes contenant les protéines Wnts (Gross et al., 2012) ; la syntaxin-1A quant à elle, serait nécessaire à la sécrétion d'exosomes contenant la protéine Evi (Koles et al., 2012). En conclusion, dans différents types cellulaires, divers complexes SNARE pourraient réguler la fusion de différents organites, mais différents SNARE pourraient également réguler la fusion à la membrane plasmique de différentes sous-populations de MVB. Par conséquent, l'inhibition d'une seule SNARE n'affecterait qu'un sous type particulier d'exosomes.

Les cellules en culture sécrètent des exosomes généralement sans stimulus extérieur. En revanche, on ne peut exclure qu'un signal puisse déclencher ou moduler la sécrétion des exosomes par des cellules en culture.

Différentes études ont montré l'importance des protéines Rab GTPases dans la régulation de la sécrétion des exosomes. La protéine Rab11 a été la première décrite dans des cellules K562, où la surexpression d'une protéine Rab11 mutée empêchant la liaison du GTP inhibait la sécrétion des exosomes (Savina, Vidal, et Colombo, 2002). Plus tard, des auteurs (Ostrowski et al., 2010) ont montré que les protéines Rab27a et Rab27b avaient un rôle important dans la sécrétion des exosomes en adressant les MVB à la périphérie cellulaire et en favorisant l'amarrage à la membrane plasmique. Parallèlement, l'utilisation d'un mutant dominant négatif de Rab35 a permis de montrer que la protéine Rab35 régule la libération des exosomes dans des cellules oligodendrogliales murines (Hsu et al., 2010).

1.4.3 Réintégration des exosomes et communication intercellulaire

Plusieurs mécanismes de réintégrations des exosomes dans des cellules autres que celles d'origine ont été proposés. Plusieurs études ont décrit le transfert d'information génétique par les exosomes (Skog et al., 2008 ; Valadi et al., 2007). Les conditions environnementales auraient également un rôle dans ce mécanisme : le pH acide serait favorable ainsi que la présence de lipides (Parolini et al., 2009).

a) les exosomes pourraient fusionner avec les cellules réceptrices, et alors relâcher leur contenu pour activer des cascades de signalisation intracellulaire (Mathivanan, Ji, et Simpson, 2010). Il est décrit une réintégration globale des exosomes plutôt que leur fusion avec la membrane plasmique (Zakharova, Svetlova, et Fomina, 2007). Par exemple, les monocytes et macrophages réintègrent complètement des exosomes de cellules T par un mécanisme qui implique des phosphatidylsérines.

b) les exosomes pourraient être internalisés par les cellules réceptrices sans relâcher leur cargo dans la cellule. L'utilisation de lipides colorés par du DiD, montre qu'après réintégration des exosomes, l'ensemble de la fluorescence reste groupé et ne se localise pas à la membrane plasmique. De plus, les protéines exosomales restent co-localisées avec les lipides exosomaux, alors que la fusion devrait induire leur éloignement et la dilution des protéines exosomales dans le cytosol (Tian et al., 2010). Pour finir, ce mécanisme de réintégration nécessite un réseau d'actine. Il est « énergie dépendant » car bloqué à 4°C à l'inverse de la fusion des membranes.

Les deux voies de réintégration des exosomes, soit par fusion de la membrane plasmique (a), soit par intégration complète *via* l'endocytose ou la phagocytose (b), dépendraient des interactions entre les molécules de surface des exosomes et celles des cellules réceptrices en fonction de leur origine tissulaire (Parolini et al., 2009).

1.5 Rôle des exosomes

1.5.1 Rôle des exosomes dans l'immunité

La réponse immunitaire débute par la reconnaissance d'un antigène par des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) telle que les cellules dendritiques (CD), les macrophages ou certains lymphocytes B (LB). L'antigène va être phagocyté ou endocyté, et un peptide de cet antigène sera présenté *via* le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII). La présentation de l'antigène va permettre l'activation de lymphocytes T (LT) auxiliaires, possédant le marqueur CD4 (CD4+). Ces LT CD4+ vont d'une part aider à l'activation des LB *via* des interleukines (IL) afin que ceux-ci deviennent des plasmocytes producteurs d'anticorps, et d'autre part promouvoir la prolifération des lymphocytes T CD8+ via la production d'IL-2. Ces LT CD8+ sont activés par les

cellules de l'organisme infectées et présentant un antigène *via* leur CMHI qui pourra alors détruire la cellule infectée.

De nombreuses études ont été menées sur les exosomes issus de cellules du système immunitaire, et leur implication à tous les niveaux de la réponse immunitaire a été démontrée.

Par exemple, concernant les cellules dendritiques (CD) et leur rôle de présentation de l'antigène, plusieurs groupes ont montré que les exosomes issus de CD activées avec un antigène spécifique ont la capacité d'activer des lymphocytes soit par contact direct, soit *via* l'activation d'autres CD (Figure 6) (Admyre et al., 2006 ; Luketic et al., 2007 ; Morelli et al., 2004).

Les lymphocytes B ont également la capacité d'activer des LT CD4+, précédemment activées, via leurs exosomes (Figure 6) (Muntasell, Berger, et Roche, 2007).

Outre l'activation du système immunitaire, plusieurs équipes de recherche ont démontré un rôle négatif des exosomes. En effet, des exosomes issus de lignées cellulaires tumorales sont capables d'induire l'apoptose des LT (Andreola et al., 2002 ; Czystowska et al., 2009 ; Klibi et al., 2009), d'inhiber la prolifération des LT induite par l'IL-2 (Clayton et al., 2008) ou encore de réduire la prolifération des LT CD8+ (Wieckowski et al., 2009).

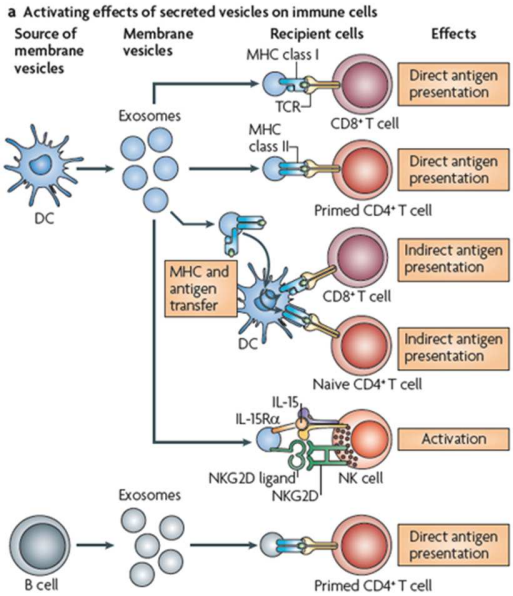


Figure 6 : Schéma résumant les principales découvertes concernant les exosomes issus de cellules du système immunitaire et leur capacité à active d'autres cellules pour amplifier ou déclencher la réponse immunitaire (Théry, Ostrowski, et Segura, 2009).

1.5.2 Rôle des exosomes dans la communication intercellulaire

Traditionnellement, la communication intercellulaire était décrite selon un mécanisme dépendant d'un contact (juxtacrine), paracrine, endocrine, exocrine ou synaptique. Il semblait que la communication intercellulaire se faisait par la reconnaissance d'un récepteur à la surface d'une cellule proche, d'un transmetteur, d'une hormone secrétée par d'autres cellules plus ou moins éloignées, ou d'un partenaire synaptique (Vlassov et al., 2012). Puis, la communication intercellulaire a été décrite aussi selon un mécanisme indépendant du contact : la diffusion de petites molécules sécrétées qui sont par la suite internalisées ou captées par un récepteur spécifique par d'autres cellules voisines.

Plusieurs protéines seraient impliquées dans l'interaction entre les exosomes et des récepteurs membranaires des cellules cibles (Figure 7, A). Par exemple, des exosomes issus de CD matures portent la protéine ICAM1 et sont capturés par le récepteur correspondant (lymphocyte function-associated antigen 1 receptor) localisé à la surface des CPA (Segura et al., 2007) et des LT (Nolte-'t Hoen et al., 2009). L'inhibition des intégrines CD51 et CD61, de CD11a et de leur ligand CD54, entraine une diminution de la réintégration des exosomes par des CD (Morelli et al., 2004). De la même façon, un traitement avec un anticorps anti-CD91 (récepteur de nombreuses Heat

Shock Protein, HSP) des cellules en culture a montré la diminution de la réintégration des exosomes (Skokos et al., 2003).

La membrane des exosomes est riche en phosphatidylsérines (PS) et plusieurs protéines sont capables de se lier à ces PS. L'observation en microscopie électronique de cellules Ba/F3 exprimant les protéines Tim1 ou Tim4, ont montré qu'elles étaient associées à des « exosomes-like vesicles » alors que les cellules Ba/F3 parentales n'avaient pas ces caractéristiques (Miyanishi et al., 2007).

D'autres études ont montré que le recrutement des exosomes de CD par des cellules T activées nécessitait des interactions LFA-1/ICAM-1. En effet, le traitement des cellules avec un anticorps anti-LFA-1 conduisait à l'inhibition du recrutement des exosomes, et ce de manière dose dépendante (Nolte-'t Hoen et al., 2009).

Une deuxième hypothèse suggère que la communication entre l'exosome et la cellule se réalise *via* des ligands solubles ayant subi un clivage protéolytique depuis la membrane exosomale (Figure 7, B). Généralement ce type de clivage s'effectue à la surface de la cellule, mais il a été montré que cela pouvait aussi avoir lieu également à l'intérieur de la cellule, dans les MVB ou même dans les exosomes sécrétés. En effet, par exemple, les ligands solubles des L1 neural adhesion molecule et CD44, sont clivés par ADAM10 (une protéine de surface avec fonction protéase), après libération des exosomes dans le milieu extracellulaire (Stoeck et al., 2006).Un mécanisme similaire a été observé dans le surnageant de cellules de cancer de l'ovaire, où deux formes de la glycoprotéine transmembranaire CD46 ont été détectées : une soluble issue du clivage protéolytique et une incluse dans des nanovésicules et qui peut être clivée pour être solubilisée (Hakulinen et al., 2004).

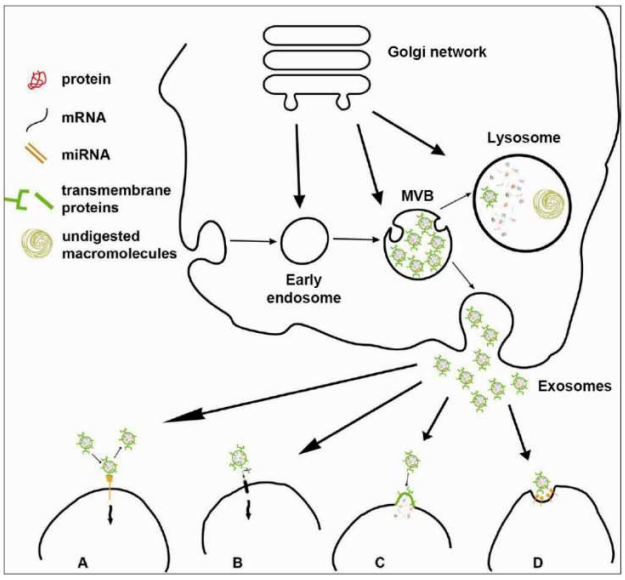


Figure 7 : Biogenèse des exosomes et leur interaction avec des cellules cibles.
(A) Les exosomes peuvent activer la signalisation intercellulaire par interaction ligand-récepteur, sans internalisation. (B) Des protéases extracellulaires peuvent cliver les protéines membranaires exosomales en ligands solubles qui se lient à un récepteur à la surface cellulaire. La cellule cible peut faire fusionner sa membrane et celle des exosomes pour les réintégrer. Ils déversent alors leur contenu dans le cytoplasme. (D) La cellule cible peut internaliser les exosomes par des mécanismes d'endocytoses (p.ex. phagocytose ou macropinocytose) (Urbanelli et al., 2013).

1.5.3 Exosomes comme réservoir de biomarqueur

Comme nous l'avons vu précédemment, les exosomes interviennent dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Beach et al., 2014). Ils ont tout d'abord été décrits comme un moyen pour les réticulocytes de renouveler leurs protéines membranaires, plus particulièrement d'éliminer des protéines et ARN devenus inutiles pour la cellule (Vlassov et al., 2012). Plus récemment, de nombreuses études ont montré leur rôle dans la communication et le transfert de matériel intercellulaire, dans la régulation de la réponse immunitaire, la présentation de l'antigène ou la propagation de pathogène (Beach et al., 2014).

L'implication des exosomes dans l'immunité et la communication intercellulaire suggère un potentiel énorme des exosomes en tant que réservoir de biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques en pathologie humaine (Beach et al., 2014).

Le recours à des biomarqueurs de pathologie est de nos jours, de prime importance dans la prévention, la détection, le diagnostic et le pronostic d'une maladie. Les exosomes isolés de

différents liquides biologiques pourraient alors fournir des biomarqueurs et les premières études ont concerné des pathologies de type cancer, maladies génétiques et même le vieillissement, et également le suivi de l'efficacité thérapeutique (Tickner et al., 2014). En effet, les exosomes ont démontré contenir un cargo en protéines et acides nucléiques qui reflète l'état de la cellule d'origine. Un éventuel passage de l'état physiologique à l'état pathologique pourrait être détecté dans les exosomes issus des liquides biologiques.

2 Approches protéomiques pour la recherche et la validation de biomarqueurs dans les liquides biologiques

2.1 Définition et évolution du concept de biomarqueur

La définition des biomarqueurs moléculaires a été proposée par le National Institute of Health (Etats Unis). Elle postule qu'un ensemble de molécules provenant d'un tissu ou d'un liquide biologique (transcrits, microARNs, protéines, lipides, sucres etc…) est caractéristique d'un état normal ou pathologique. Les biomarqueurs reflètent des « caractéristiques biologiques mesurées de façon objective et évaluées comme des indicateurs soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique ».

Les recherche de biomarqueurs a pris un nouvel essor avec l'arrivée de l'ère « -omique ». Simultanément, les progrès médicaux ont conduit à proposer une stratégie de prévention pour des maladies chroniques dont les facteurs de risque sont maintenant bien identifiés, et à mettre en place une intervention thérapeutique précoce pour de nombreux cancers et maladies neurodégénératives. Dans ce contexte, un biomarqueur a pour objectif d'aider au diagnostic précoce avant l'apparition de défaillance d'organe. Dans certains cas, la détection d'un biomarqueur pourra prévenir l'apparition d'une maladie (action préventive), suivre son évolution (stratification) ou encore surveiller l'efficacité d'un traitement (Wright et al., 2009).

L'objectif principal d'un biomarqueur est de discriminer les sujets qui évolueront vers une maladie de ceux qui ne la développeront pas. Cela nécessite de prouver l'association physiopathologique entre la maladie et le biomarqueur. En théorie, ce n'est pas un seul biomarqueur mais un groupe de biomarqueurs qui serait meilleur révélateur de l'apparition de la maladie du fait de la dépendance vis-à-vis de la génétique et/ou de l'environnement global de l'individu (Anderson, 2005). Cette hypothèse est soutenue par les analyses des métabolites (Jellum et al., 1981) et la biologie clinique (Robertson et al., 1980), puis plus récemment, par les résultats de l'analyse protéomique (Petricoin et al., 2002). Ainsi, dans le cadre d'un suivi de l'inflammation chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, l'analyse du sérum des

patients par l'électrophorèse bidimensionnelle a permis d'identifier 19 protéines sériques qui discriminent les patients non atteints des patients atteints, et ce de façon plus efficace que le suivi par un seul marqueur classique, comme la protéine C réactive (Doherty et al., 1998).

D'un point de vue technologique, l'émergence des méthodes d'analyses multiplexées par les « microarray » a favorisé cette recherche des biomarqueurs en profil protéique. Un des premiers exemples est l'identification par une équipe hollandaise de 550 gènes qui ont permis de regrouper les patientes atteintes de cancer de sein au même stade de la maladie et répondeuses au traitement de celles pour lesquelles le traitement s'est révélé inefficace (van 't Veer et al., 2002).

Ces nouvelles approches qui reposent sur la détection d'un ou plusieurs biomarqueur spécifique de pathologie ont l'intérêt d'être relativement simples une fois la technologie bien prise en mains. Ces recherches de biomarqueurs pourront être réalisées chez les patients dans le cadre de leur prise en charge habituelle et aussi dans le cadre des essais cliniques. Cependant, il faut bien connaitre les limites de cette stratégie des biomarqueurs. En effet, chaque biomarqueur peut avoir une cinétique différente en fonction d'une pathologie, d'un individu, etc… Les mesures en plusieurs temps du nycthémère permettront d'établir la cinétique de concentration du(des) biomarqueur(s), de suivre son évolution par rapport à la valeur constitutive de chaque individu (Almufti et al., 2014). Ainsi, les équations décrivant les profils cinétiques des biomarqueurs pourraient être une alternative malgré leur complexité et la nécessité d'un plus grand nombre de prélèvements. Par exemple, cette approche « de biomarqueurs cinétiques » a été utilisée par l'équipe de You et coll. dans le cadre d'un essai clinique concernant le traitement des tumeurs germinales non séminomateuses (You et al., 2010) et pour une étude pronostique visant à évaluer le taux de résistance à un traitement dans les tumeurs trophoblastiques gestationnelles à faible risque (You et al., 2013).

Les biomarqueurs sont recherchés dans les liquides biologiques tels que le sérum, le plasma, les urines, le liquide céphalo-rachidien, les larmes, le sputum, etc. Ces prélèvements sont pratiqués dans le cadre de la prise en charge habituelle des patients et sont relativement plus simples à réaliser par rapport aux prélèvements par biopsie. Les organes ou tissus défaillants

déversent dans les liquides biologiques les biomarqueurs caractéristiques, et leurs variations qualitatives et/ou quantitatives peuvent être le témoin d'une atteinte pathologique (Lescuyer, Hochstrasser, et Rabilloud, 2007).

2.2 Approches protéomiques dans la recherche de biomarqueurs

L'identification d'une signature moléculaire est constituée de deux phases, l'une de « découverte » et l'autre de « validation » (Figure 8).

1. La phase de « découverte »

Il s'agit d'une recherche sans *a priori*, au cours de laquelle on met en évidence les protéines exprimées de façon différentielle entre des états bien définis ainsi que leur abondance relative.

La phase découverte peut être réalisée soit à l'aide de modèle animal ou cellulaire, soit directement sur des échantillons provenant de patients biens caractérisés. A l'issue des analyses par MS et de bio-informatique, une liste de protéines différentiellement exprimées est identifiée pour caractériser l'état normal de celui pathologique. Cette liste ou « profil protéique » peut être constituée de vingt à plusieurs centaines de protéines candidates. Pour la phase de découverte, le « False Discovery Rate » (FDR) qui correspond au taux de faux positifs (Baccini et al., 2005)) peut être assez élevé, en particulier pour les protéines de faible abondance. Ces protéines de faible abondance représentent une des difficultés de la phase de découverte, qui nécessitent de nombreuses mises au point techniques pour la préparation de l'échantillon et la séparation de ces protéines des protéines plus abondantes.

2. La phase de validation

Au cours de la phase de validation, la liste de protéines établie pendant la phase de découverte ou encore provenant d'approches de découverte alternative comme le

profilage transcriptionnel (Rifai, Gillette, et Carr, 2006) est confrontée à l'aveugle à un certain nombre d'échantillons. La première étape sera la « qualification » des protéines sélectionnées (Figure 8) qui a pour objectif de confirmer l'expression différentielle des protéines candidats dans les différents groupes d'échantillons. Aussi, cette phase doit valider la méthode de préparation des échantillons avant analyse afin qu'elle soit compatible avec une application clinique.

Ces deux phases de découverte et de qualification visent à confirmer le lien entre le biomarqueur et la pathologie étudiée, et recherchent surtout la sensibilité du biomarqueur (un échantillon « pathologique» sera testé positif) plutôt que sa spécificité (un échantillon « normal » doit être négatif) (Rifai, Gillette, and Carr 2006).

Après la phase de qualification, l'étape de vérification du panel de protéines candidates est nécessaire à l'analyse statistique pour tenir compte de l'influence des facteurs environnementaux, génétiques et biologiques. A l'issue de cette analyse qui intègre un très grand nombre d'échantillons (jusqu'à plusieurs centaines), le nombre de protéines candidates peut diminuer de façon significative. Enfin, ces dernières protéines sélectionnées pourront entrer dans la phase de développement pour leur utilisation dans le cadre d'un essai clinique.

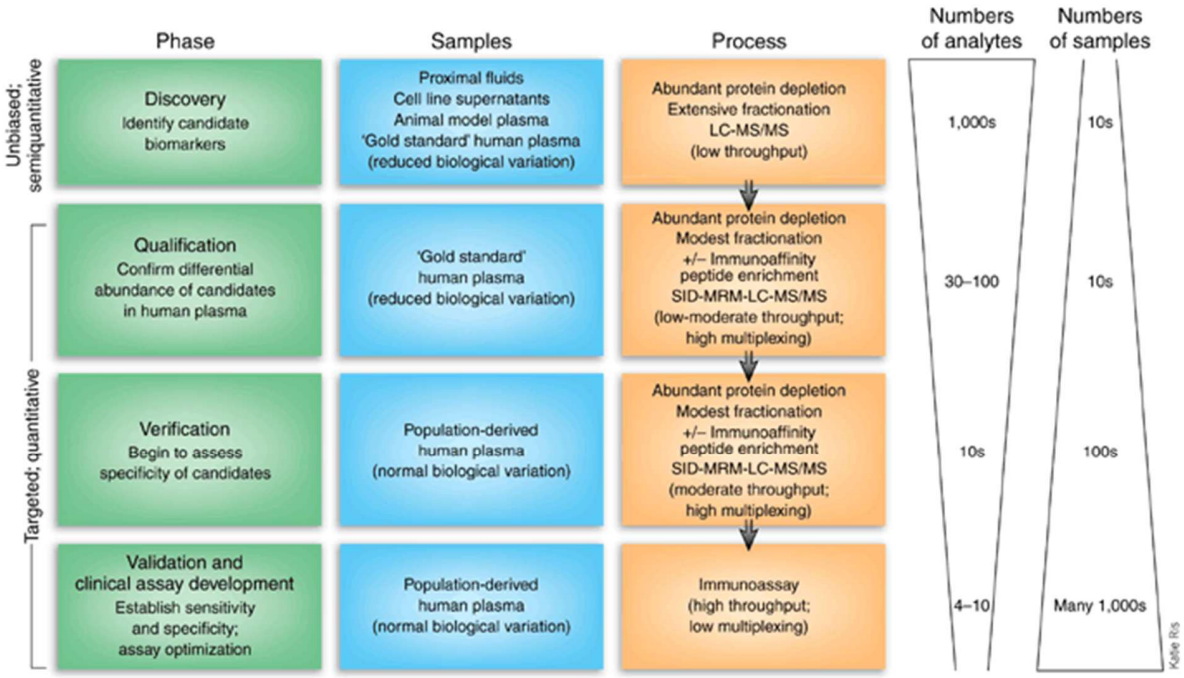


Figure 8 : Schéma représentant les phases de découverte et de validation de biomarqueurs par l'analyse protéomique (Rifai, Gillette, et Carr, 2006).

2.2.1 Protéomique dans la phase de découverte des biomarqueurs

Deux méthodes d'analyse protéomique sont appliquées au cours de la phase de découverte (Figure 9).

La première méthode d'analyse des protéines est celle du profilage. Cette approche repose sur l'analyse par MS simple. Elle permet d'obtenir un profil de protéines et de peptides présents dans un échantillon donné. Ces profils sont représentés par un spectre dont chaque pic va correspondre à un ion (peptide ou protéine chargé), avec en abscisse le ratio masse/charge (m/z) de cet ion. Dans un deuxième temps, la quantification relative est effectuée afin d'appréhender la variation d'abondance relative de certains de ces pics de peptides/protéines dans les échantillons pathologiques versus normaux. Cette approche a été utilisée par exemple, pour le typage des micro-organismes par l'analyse MALDI-TOF (Carbonnelle et al., 2011).

Une autre méthode permet l'identification et la quantification des biomarqueurs potentiels de pathologie et repose sur l'analyse par MS dite en tandem, accompagnée d'un

fractionnement multidimensionnel en amont. A minima, l'analyse comporte un fractionnement des peptides par une méthode séparative (chromatographie ou électrophorèse capillaire (CE) par exemple), suivie par l'analyse par un spectromètre de masse en tandem. Celui-ci permet la fragmentation des ions suivie par leur identification. On appelle « peptidomique » l'analyse réalisée sur des peptides endogènes, et « protéomique », celle réalisée sur des peptides issus d'une digestion enzymatique. Ces approches sont particulièrement chronophages et nécessitent une analyse bioinformatique poussée afin d'identifier les protéines correspondantes aux spectres obtenus.

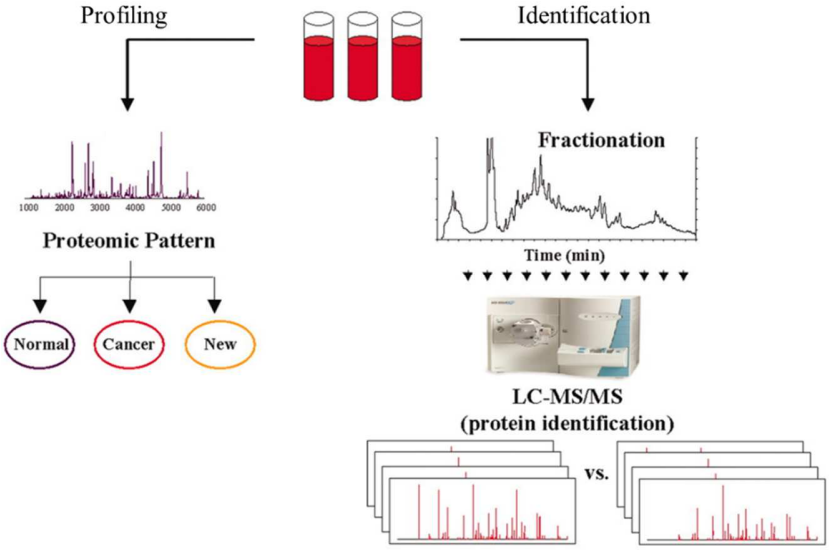


Figure 9 : Schéma représentant les deux types d'analyses protéomique possibles lors d'une phase de découverte de biomarqueurs (Veenstra et al., 2005).

2.2.1.1 Phase découverte : Profilage des protéines

Le profilage permet d'obtenir le profil peptidique et protéique natif, mais ne permet pas d'identifier la protéine à l'origine de la signature protéique ou peptidique (Dudley, 2014).

Une des méthodes utilisées pour obtenir le profil protéique d'un échantillon est le MALDI-TOF. Ce type d'instrument a été inventé à la fin des années 80 (Karas et Hillenkamp, 1988 ; Tanaka et al., 1988). Son principe consiste à co-cristalliser avec l'échantillon, une matrice qui donne au complexe une meilleure absorption de l'énergie dans l'ultraviolet. Le bombardement du

complexe pendant quelques nanosecondes par un faisceau laser, entraine une désorption de l'analyte et une ionisation des protéines et/ou peptides, souvent avec une seule charge. Les ions produits sont alors accélérés par un champ électrique et analysés dans un tube TOF. Dans cette partie, les ions de plus faible ratio m/z arrivent plus rapidement au détecteur que les ions de plus haut ratio m/z. Le spectre ainsi obtenu consiste en un ensemble de pics qui correspondent chacun à une protéine à un ratio m/z décrit sur l'axe des abscisses, avec une intensité décrite sur l'axe des ordonnées (Hortin, 2006).

Les principaux avantages du MALDI-TOF reposent sur sa robustesse et sa stabilité. En effet, une fois l'échantillon contenant les protéines, déposé et co-cristallisé sur la plaque cible, il peut être analysé de nombreuses fois (en ajustant les tirs laser sur une autre partie du cristal), et aussi, il peut être soumis à une digestion par la trypsine directement sur la plaque cible afin d'identifier les protéines présentes dans l'échantillon (Zuberovic et al., 2004).

En revanche, le MALDI-TOF permet la détection essentiellement des protéines les plus abondantes (Hortin, 2006). Pour améliorer la sensibilité de la méthode, des techniques de préfractionnement devront être mises en œuvre pour enrichir l'échantillon en protéines d'intérêt. Il s'agit de techniques de chromatographie liquide, d'extraction en phase solide, ou encore d'immuno-purification (Hortin, Meilinger, et Drake, 2004 ; Villanueva et al., 2004). Avec le SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation), une méthode dérivée du MALDI-TOF (Shiwa et al., 2003), le préfractionnement est directement réalisé sur la plaque cible. Intéressant sur le principe, le SELDI présente les mêmes limitations que le MALDI, et des problèmes de reproductibilité liés aux variations entre deux puces utilisées pour une analyse.

La méthode MALDI-TOF présente des limites techniques (Albrethsen, 2007) :

- La fenêtre de masse sur laquelle on peut réaliser un profil protéique par MALDI-TOF est limitée généralement entre 400 et 15 000 m/z (Albrethsen, 2007).
- Les analyseurs de type TOF ont un assez faible pouvoir résolutif en mode linéaire en particulier dans la zone des 10 000 à 15 000 m/z.

- La faible reproductibilité de la quantification par l'analyse MALDI-TOF, est due en partie aux étapes de co-cristallisation de l'échantillon avec la matrice et à la désorption/ionisation des analytes. En effet, la matrice utilisée peut entrainer la formation de cristaux plus ou moins homogènes en forme et taille, dans lesquels les protéines auront tendance à s'accumuler à la périphérie, ce qui peut influencer l'intensité de la détection entre plusieurs bombardements laser du cristal (Cohen et Chait, 1996).

Une autre méthode utilisée pour le profilage protéique est la CE couplée à une détection avec un spectromètre de masse (CE-MS). La CE permet de séparer les protéines en une seule étape avec une grande résolution grâce à leur migration en fonction de leur masse et charge à travers un gel contenu dans un capillaire et un champ électrique de haut voltage (Fliser et al., 2007). La CE peut être couplée à une source de type électronébuliseur (ESI) ou un analyseur de type TOF. La source ESI utilise l'énergie électrique pour passer les ions présents en solution en phase gazeuse avant d'être analysés par le MS (Ho et al., 2003). La CE-MS offre plusieurs avantages comme la séparation rapide des protéines avec une bonne résolution, la compatibilité du système avec différents tampons et analytes, la reproductibilité inter-échantillons des temps de migration (Mullen et al., 2012). L'utilisation d'un débit faible et constant permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse MS (Neusüss, Pelzing, et Macht, 2002). Cependant, cette méthode présente un inconvénient majeur : elle n'est pas applicable aux protéines de haut poids moléculaire. En effet, les tampons généralement utilisés dans ce cas, sont de faible pH ce qui risque d'entraîner une précipitation des protéines dans les capillaires de chromatographie. Aussi, le faible volume d'échantillon injecté en CE limite la sensibilité de l'analyse.

2.2.1.2 Phase découverte : Peptidomique et Protéomique

2.2.1.2.1 Peptidomique

Le terme « peptidomique » est défini à la fin des années 90 (Schrader, Schulz-Knappe, et Fricker, 2014), par l'analyse systématique des protéines de faible poids moléculaire et/ou des peptides endogènes dérivés d'un échantillon biologique non traité préalablement par digestion protéolytique.

La peptidomique comprend généralement l'étude des polypeptides de masse ≤20 kDa, même s'il ne s'agit pas d'une limite claire et définitive (Bauça, Martínez-Morillo, et Diamandis, 2014). Les approches peptidomiques sont utilisées pour analyser les cytokines, des facteurs de croissance ou encore des neuropeptides (Zougman et al., 2008). Dans les systèmes biologiques, les peptides sont issus du clivage protéolytique par des peptidases endogènes. Ainsi, l'abondance des peptides dans les liquides biologiques dépend de l'équilibre entre l'activité des protéases et celles de leurs inhibiteurs (Bauça, Martínez-Morillo, et Diamandis, 2014). De plus, des événements particuliers, physiologiques ou pathologiques, peuvent amener à une régulation différentielle de l'expression des protéines ou de l'activité des protéases (Villanueva et al., 2006).

2.2.1.2.2 Protéomique

L'analyse protéomique à haut débit, appelée aussi « shotgun » par analogie avec les techniques de séquençages d'ADN, permet l'identification des protéines d'un mélange complexe par la spectrométrie de masse dite en tandem (MS/MS). Cette technique repose sur l'analyse par MS de peptides issus de la digestion enzymatique des protéines. Le défi de cette approche est la complexité du mélange de peptides provenant de toutes les protéines présentes initialement. Des algorithmes de plus en plus sophistiqués sont utilisés afin de reconstruire et identifier à partir des peptides détectés, la séquence protéique d'origine.

2.2.1.2.3 Instruments

La protéomique et la peptidomique utilisent des instruments de type MS en tandem qui fonctionnent en deux étapes. La première permet de sélectionner par son rapport m/z l'ion parent à fragmenter, et la seconde d'analyser les fragments d'ions (ions fils) obtenus après collision de l'ion parent avec des atomes d'un gaz inerte tel que l'argon ou l'hélium (Yates, 1998). Ces deux étapes peuvent se dérouler en tandem dans l'espace ou dans le temps.

La MS en tandem dans l'espace est réalisée à partir de deux analyseurs placés en série, pour que les 2 étapes puissent se dérouler en même temps, mais dans deux espaces différents.

C'est le cas par exemple des appareils de type quadripôle-TOF (Q-TOF) : la cellule de collision est placée entre un analyseur quadripôle et un TOF. Ce type d'analyseur en tandem peut être couplé avec des sources de type MALDI ou ESI. La MS tandem présente une résolution importante (40 000[1], Tableau 2) et une bonne précision de masse (2 ppm (partie par million), Tableau 2).

La MS en tandem dans le temps est obtenue lorsque les deux analyses ont lieu dans le même espace (analyseur) mais à deux instants différents, comme dans les cas des MS de type trappe ionique (IT). Une source de type ESI est typiquement couplée à une trappe à ions. En amont, une séparation de type CE ou CLHP (chromatographie en phase liquide à haute performance) est utilisée. La trappe à ions réalise d'abord un spectre « full MS » à partir des ions présents caractérisés par leur rapport m/z et leur intensité. Puis, les ions aux intensités les plus élevées vont être sélectionnés par leur rapport m/z, afin d'être fragmentés. L'intérêt majeur de la trappe à ions est sa capacité à accumuler des ions pendant une certaine période avant d'en réaliser la fragmentation ultérieure. La trappe à ions présente une bonne sensibilité. De plus, elle peut réaliser successivement des analyses de type MS^n. Cependant, sa résolution est assez faible (4 000, Tableau 2) et le fait de piéger les ions pendant une période plus ou moins longue, peut entrainer des biais dans la fragmentation et donc des artefacts gênant le séquençage ultérieur des peptides.

Le premier instrument utilisant la MS à haute résolution (>100 000, Tableau 2) et commercialisé, est le FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance). Sur ce type d'appareillage, la source ESI est suivie d'une trappe à ions qui a pour but de collecter les ions avant de les injecter dans la cellule ICR (Ion Cyclotron Resonance) qui réalise la mesure précise des rapports m/z des ions fragmentés.

Le spectromètre de masse du type LTQ-Orbitrap (Linear Trap Quadrupole) a été développé en 2005. Dans cet instrument, l'aimant supraconducteur de l'ICR a été remplacé par un analyseur Orbitrap. Il s'agit toujours d'un analyseur avec transformée de Fourier mais où les ions sont

[1] La résolution est la capacité d'un instrument à séparer deux pics de rapport masse sur charge (m/z) proches (Murray et al., 2013). Il est exprimé par : $R = \frac{m}{\Delta m}$, m étant le rapport m/z de l'ion d'intérêt et Δm la largeur du pic à mi-hauteur.

confinés par un champ électrique, faisant de cet appareil un spectromètre de masse de paillasse. Le LTQ-Orbitrap a permis une grande avancée en protéomique à haut débit, en combinant un haut pouvoir résolutif (>100 000), une grande précision de masse et une bonne reproductibilité (Mann and Kelleher 2008). Deux appareils de ce type sont particulièrement utilisés : le Velos et le Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Pour le LTQ-Orbitrap Velos, les spectres MS sont acquis par l'Orbitrap, tandis que les spectres MS/MS sont acquis soit dans la trappe à ions lors de la fragmentation par CID (Collision Induced Dissociation), soit dans l'Orbitrap lors de la fragmentation par HCD (Higher-energy Collision Dissociation). Le Q-Exactive permet d'acquérir les spectres MS et MS/MS dans l'Orbitrap.

2.2.1.2.4 Identification des protéines

L'augmentation rapide du nombre des séquences protéiques introduites dans les bases de données, combinée à l'usage d'ordinateurs et d'algorithmes de plus en plus performants, ont réduit le délai de traitement des spectres de masse en tandem. Yates et coll. (1996) ont développé une approche qui utilise l'information de la fragmentation des peptides contenue dans les spectres MS en tandem pour identifier des séquences d'acides aminés caractéristiques d'une protéine, qui est alors renseignée dans les bases de données de protéines et nucléotides.

Les spectres MS en tandem contiennent plusieurs informations :

- Tout d'abord la masse du peptide : si le spectre du peptide est obtenu avec une grande précision, elle seule peut réduire le nombre de séquences possibles à un faible nombre et seulement si elle est couplée avec la spécificité de l'enzyme utilisée pour obtenir le peptide. Afin d'identifier une seule séquence d'acides aminés correspondante, il est possible de reconstruire, *in silico*, un spectre modèle pour les fragments de chacune des séquences potentielles, et de les comparer à celles observées en MS (Eng, McCormack, et Yates III, 1994). Cette méthode utilise la similarité entre le spectre reconstruit et le spectre obtenu expérimentalement.

L'autre niveau d'informations disponibles dans un spectre MS en tandem, est la séquence d'acides aminés en elle-même. Le nombre de séquences peptidiques qui vont répondre positivement aux deux niveaux d'informations est alors très réduit.

	Quadrupole	Ion Trap	Time-Of-Flight	Time-Of-Flight Reflectron	Orbitrap	FTMS	QTOF
Accuracy	0.01% (100 ppm)	0.01% (100 ppm)	0.0005% (5 ppm)	0.0002% (2 ppm)	0.0001% (1 ppm)	0.0001% (1 ppm)	0.0002% (2 ppm)
Resolution	4 000	4 000	10 000	15 000	140 000	1 000 000	40 000
m/z range	4 000	4 000	>300 000	10 000	6 000	10 000	10 000
Scan Speed	1 s	1 s	msec	msec	1 s	1 s	1 s

Tableau 2 : Tableau de comparaisons des spécifications des différents analyseurs de masse.
Le pouvoir résolutif est la capacité d'un instrument à séparer deux pics de rapport masse sur charge (m/z) proches (Murray et al., 2013). Il est exprimé par : $R = \frac{m}{\Delta m}$, m étant le rapport m/z de l'ion d'intérêt et Δm la largeur du pic à mi-hauteur.

2.2.1.3 Phase découverte : Quantification des protéines

La quantification des protéines par MS reste un des points clés de toute analyse protéomique. En effet, c'est elle qui permettra de détecter des variations d'abondance des peptides et/ou protéines à l'intérieur d'un groupe d'individus, entre deux états physiologiques (avant et après traitement par exemple), ou entre deux groupes d'individus qui sont chacun dans des états différents (témoins *vs.* malades par exemple).

Il existe deux types de quantification : relative et absolue. La quantification relative compare le niveau d'abondance des protéines entre différents échantillons de deux ou plusieurs groupes, avec comme résultat un facteur d'augmentation ou de diminution entre ces groupes. La quantification absolue permet de déterminer la concentration exacte d'une ou plusieurs protéines dans un échantillon.

Les premières techniques de quantification en protéomique reposaient sur la séparation des protéines en gel bidimensionnel 2D, l'appréciation des spots d'intensité variable et l'identification de la protéine contenue dans un spot d'intérêt par MS. La révélation des protéines

sur ces gels utilise soit des colorants, des fluorophores ou encore la radioactivité. Cette technique présente une bonne sensibilité (jusqu'au nanogramme selon les colorations), une bonne linéarité et une gamme dynamique large. Cependant, l'usage des gels 2D limite l'analyse protéomique aux protéines abondantes et solubles. De plus, il est indispensable de disposer d'un volume d'échantillon suffisant pour la réalisation de nombreux réplicats. Aussi, le travail d'analyse d'image des gels 2D peut se révéler opérateur-dépendant (Bantscheff et al., 2007).

De façon générale, les étapes d'enrichissement et de fractionnement des protéines, nécessaires pendant la phase de découverte des biomarqueurs, risquent d'induire de la variabilité entre les échantillons.

2.2.1.3.1 Quantification label-free

La quantification relative de type « label-free » (ou sans marquage) repose sur le « spectral counting » (comptage de spectres) ou le « extracted ion chromatogram » (XIC, mesure de l'intensité de l'intégration des pics chromatographiques des ions).

Le « spectral counting » nécessite la fragmentation d'une protéine à quantifier en au moins deux à trois peptides. Cette approche est basée sur l'observation que plus une protéine est abondante, plus le spectromètre de masse fournit un nombre important de spectres lui correspondant. La quantification relative est réalisée en comparant le nombre de spectres obtenus pour une même protéine sur différentes analyses MS (Wang et al., 2008). L'avantage de cette approche est que l'identification et la quantification d'une protéine sont obtenues par une collecte poussée des données MS/MS au cours de l'analyse. Les inconvénients sont liés à un effet de saturation pour les protéines les plus abondantes (Old et al., 2005) et à la dépendance à la qualité de l'identification qui peut mener à une imprécision de quantification. De plus, le « spectral counting » est très variable selon les peptides, et nécessite donc de nombreuses observations.

La quantification relative par XIC a été possible grâce au fait que l'intensité du signal d'un ion est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon (Bondarenko, Chelius, et

Shaler, 2002). Avec cette méthode, la quantification du peptide est réalisée en intégrant l'aire sous la courbe du pic chromatographique de chaque de rapport *m/z* détecté, l'identification étant simultanément réalisée par la fragmentation de ces ions en MS/MS. Ainsi, on obtient l'information sur la quantification et l'identification du peptide correspondant. Ce type de quantification est théoriquement supérieur au « spectral counting » pour peu que la résolution de l'instrument soit suffisante. Cet avantage est d'autant plus marqué sur des espèces en faible abondance, pour lesquelles la mesure continue est plus riche en information quantitative qu'un comptage de spectres ponctuel (Cox et al., 2014).

Le développement des spectromètres de masse à haute résolution, la précision de masse obtenue et l'augmentation du taux de peptides identifiés grâce à ces spectromètres, ont été des éléments clés pour le développement et la qualité des méthodes de quantifications « label-free ». Si la précision de masse aide à l'identification du peptide, c'est la haute résolution des spectromètres de masse qui est cruciale pour une quantification précise (Cox et Mann, 2008). A faible résolution de masse, les intégrations d'aires sous la courbe des ions sont souvent entachés d'erreur par des signaux peptidiques proches, empêchant une quantification précise (Andersen et al., 2003).

Plusieurs problèmes sont néanmoins à noter (Zhu, Smith, et Huang, 2010). Tout d'abord des différences dans l'intensité des pics des peptides peuvent survenir entre échantillons, à cause de variations dans la préparation de l'échantillon ou encore dans le chargement de l'échantillon. Cela implique des étapes de normalisation. Aussi, toute variation expérimentale sur les temps de rétention (temps écoulé entre l'injection de l'échantillon dans le système chromatographique et la détection du signal produit par l'analyte dans le chromatogramme) ou les rapports m/z, risque de compliquer l'analyse MS des échantillons. Les variations de temps de rétention peuvent survenir suite à de minimes variations de débit ou de pH de phase mobile, de modification de la qualité de séparation de la colonne après les nombreuses injections. Ainsi, il est indispensable de réaliser plusieurs réplicats (en général trois) de l'échantillon.

De plus, les spectres de fragmentation acquis ne constituent qu'une petite fraction de l'ensemble des informations dans une analyse MS. La sélection des ions parents par l'instrument

est semi-aléatoire et conduit à une collecte de spectres non reproductible. Ainsi, un peptide pourrait être dans les limites de détection du MS, mais non sélectionné pour la fragmentation parce que l'ion parent est « caché » par d'autres espèces plus abondantes. De même, en raison de cet échantillonnage aléatoire, seulement ~70% des identifications peptidiques sont partagés entre les réplicats (Finney et al., 2008). En raison de ces complications, il est plus approprié d'utiliser les informations contenues dans les spectres MS pour faire les comparaisons entre les échantillons et détecter les variations d'intensité tandis que les spectres MS/MS permettent d'identifier les protéines.

La nécessité de réaliser des réplicats entraine une augmentation à la fois : du temps machine nécessaire pour réaliser ces analyses ; de la quantité de données MS générées ; et du temps d'analyse nécessaire pour pouvoir comparer les variations d'intensité des pics de plusieurs milliers de peptides sur les triplicats. Le développement des outils informatiques a été alors indispensable afin d'automatiser cette tâche (Cox et Mann, 2008).

2.2.1.3.2 Stable ISOTOPE labelling

Le concept de ces types de quantification repose sur l'ajout d'une « étiquette » qui va introduire une variation minime de masse dans une protéine ou un peptide, tout en ne modifiant pas ses propriétés physico-chimiques. Deux étiquettes sont ajoutées. La première, légère, est ajoutée à des protéines ou peptides dérivés des échantillons en condition A tandis que la deuxième, lourde, à des échantillons semblables mais en condition B. En amont de l'analyse MS, les protéines ou peptides étiqueté(e)s provenant des conditions A et B, sont mélangés en quantités égales. Les propriétés des peptides n'étant pas modifiées par l'étiquette, ils conservent le même temps de rétention dans les deux conditions, cependant l'écart de masse connu entre les deux étiquettes pourra être déterminé en MS ou MS/MS, selon le marquage de l'échantillon. L'intensité des ions reflétera de l'abondance de la protéine dans une certaine condition et permettra sa quantification relative.

a) Stable Isotope Labelling Amino acids in Cell culture (SILAC)

Cette technique, surtout adaptée à la culture cellulaire, consiste à ajouter dans le milieu de culture des acides aminés marqués avec des isotopes stables. Ils sont alors intégrés dans les protéines nouvellement synthétisées pendant la croissance cellulaire (Ong, Foster, et Mann, 2003). Les premiers marquages de ce type s'effectuaient avec de l'azote 15 permettant de comparer 2 échantillons. Le développement de la méthode SILAC qui implique l'incorporation d'arginine et lysine marquées avec des isotopes froids, a permis d'augmenter la capacité d'analyse multiplexée des échantillons (Ong et al., 2002). Les échantillons sont mélangés après la lyse cellulaire, avant préparation des protéines pour la MS, réduisant les biais expérimentaux.

b) Marquage deutéré

Un autre type de marquage existe et consiste à insérer une étiquette dans les protéines ou peptides à l'aide de réactions chimiques, par exemple avec les méthodes ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags) ou ICPL (Isotope-Coded Protein Label) (Gygi et al., 1999 ; Schmidt, Kellermann, et Lottspeich, 2005). Le marquage ICAT se fait spécifiquement sur les cystéines par ajout d'étiquettes marquées avec du deutérium (étiquette lourde) ou non (étiquette légère). De plus, ces étiquettes contiennent des biotines permettant la purification des protéines marquées par chromatographie d'affinité. Cette étape de purification réduit la complexité de l'échantillon mais empêche son utilisation sur des protéines qui contiennent peu de cystéines. La technique ICPL consiste elle, en l'ajout d'étiquettes deutérées ou non, sur les acides aminés avec des groupements amines libres. Les échantillons sont alors mélangés à volume égal et digérés. Les techniques ICAT et ICPL vont toutes les deux nécessiter la quantification en MS, tandis que la MS/MS permettra l'identification de la protéine. Une limite reste que seuls deux échantillons peuvent être comparés par ces techniques.

c) Marquage isobarique

Finalement, des techniques de marquage chimique avec des étiquettes isobariques (isobaric mass tag) comme le TMT (Tandem Mass Tag) (Thompson et al., 2003) ou l'iTRAQ

(Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification) (Ross et al., 2004) permettent de multiplexer jusqu'à huit échantillons en parallèle. L'iTRAQ implique l'ajout d'étiquettes de même masse globale au niveau des peptides tryptiques, et n'ayant pas de conséquences sur leurs temps de rétention. La comparaison des différentes conditions s'effectue grâce aux fragmentations des étiquettes qui n'auront pas la même masse, et dont l'intensité rapportera l'abondance de la protéine entre les différentes conditions. Un inconvénient de cette technique revient à la variabilité dans l'efficacité de l'étiquetage des peptides et la digestion des protéines.

2.2.2 Protéomique en phase de validation des biomarqueurs

La deuxième étape après la mise en évidence de biomarqueurs candidats est la validation de ces biomarqueurs comme caractéristiques d'un état, par la protéomique ciblée ou par des approches de biochimie classique (de type Western Blot ou ELISA).

2.2.2.1 Les méthodes de protéomique ciblée

La phase de « découverte » a permis de détecter des biomarqueurs candidats par protéomique à haut débit (ou par d'autres approches décrites précédemment ou encore identifiées par « data mining »[2]). La phase de validation utilise la protéomique ciblée pour mesurer la concentration des protéines d'intérêt (biomarqueurs) dans les liquides biologiques (Figure 10). Deux paramètres décrivent la sensibilité du dosage d'une protéine par MS : la limite de détection (Limit Of Detection, LOD) et la limite de quantification (Limit Of Quantification, LOQ). La LOD est la plus faible concentration de l'analyte qui peut être détectée et significativement différenciée d'un échantillon n'en contenant pas (Armbruster et Pry, 2008). La LOQ est la plus faible concentration de l'analyte qui peut être détectée et quantifiée en respectant la linéarité et les objectifs de biais et d'imprécision définis pour la méthode de dosage (Armbruster et Pry, 2008).

[2]Il s'agit d'une approche d'analyse des données bibliographiques en utilisant les approches bio-informatiques.

Plusieurs méthodes utilisant la protéomique ciblée ont été développées. Il s'agit dans l'ordre chronologique, de la SRM/MRM (Single/Multiple Reaction Monitoring), de la PRM (Parallel Reaction Monitoring) et du DIA (Data Independent Acquisition).

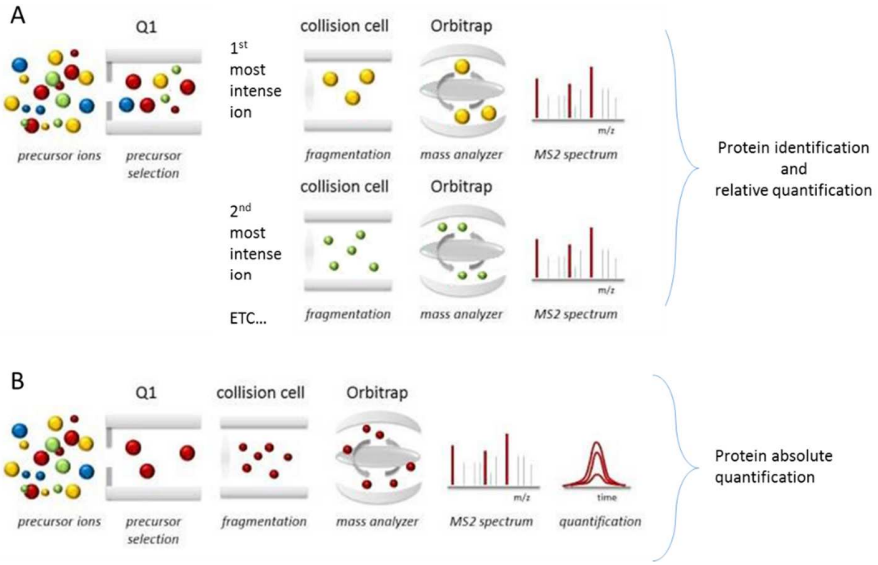


Figure 10 : Comparaison des méthodes d'analyse des protéines par protéomique à haut débit ou par protéomique ciblée En haut débit (A), l'ensemble des ions de l'échantillon sont scannés, puis sélectionnés un par un successivement pour être fragmentés. En protéomique ciblée (B), seuls les ions d'intérêt sont filtrés et sélectionnés avant d'être fragmentés. Adapté de http://www.biognosys.ch/technology/prm.html.

2.2.2.2 Phase validation : SRM/MRM

2.2.2.2.1 Définition

La SRM/MRM est l'approche de référence pour la quantification absolue de protéines et peptides (Anderson et Hunter, 2006). Cette approche nécessite trois niveaux d'information : (i) l'identification de la protéine d'intérêt est ciblée ; (ii) la sélection de deux à trois peptides qui doivent être uniques à cette protéine (peptides protéotypiques), produire un signal fort et reproductible en MS ; et enfin (iii) pour chacun de ces peptides sélectionnés, l'identification d'au moins trois ions produits (appelés transitions) qui fourniront le meilleur signal MS/MS (pour une meilleure sensibilité) et qui permettront de différencier le peptide ciblé d'autres ions interférant (pour une meilleure spécificité) (Lange et al., 2008). La SRM/MRM consiste en l'acquisition séquentielle, pendant l'élution chromatographique, des masses des ions précurseurs des

peptides présélectionnés et de leurs transitions, également présélectionnées. L'acquisition du signal MS et MS/MS permet l'obtention de tracés chromatographiques où l'intensité des pics est représentative de l'abondance du peptide dans l'échantillon (Chelius et Bondarenko, 2002). La quantification absolue est obtenue en SRM/MRM en incorporant, dans l'échantillon d'intérêt, un peptide standard marqué avec des isotopes stables. Les peptides natifs et les standards lourds ont le même temps de rétention et le même profil de fragmentation. Etant donné qu'une quantité connue du peptide lourd est ajoutée, il est possible de comparer l'aire sous la courbe de son pic chromatographique à celle du peptide natif et de calculer la concentration de la protéine dans le liquide biologique (Gerber et al., 2003).

2.2.2.2.2 Instruments

Les instruments utilisés pour la quantification absolue sont de type triple quadripôle (TQ/QQQ). La SRM/MRM repose sur la capacité des TQ/QQQ à filtrer une masse et suivre spécifiquement cet ion parent ainsi que les ions produits issus de sa fragmentation. Les instruments TQ sont composés d'un premier quadripôle qui va sélectionner l'ion parent (peptide) d'intérêt, d'un deuxième quadripôle dans lequel a lieu la fragmentation de cet ion, et d'un troisième quadripôle pour filtrer et analyser les fragments obtenus (Figure 11).

La SRM/MRM présente une bonne sensibilité envers les peptides de l'ordre de l'attomole (10^{-18}), d'une gamme dynamique s'étendant jusqu'à 5 log et d'une bonne reproductibilité des dosages (Anderson et Hunter, 2006 ; Wolf-Yadlin et al., 2007).

Cependant la SRM/MRM présente des limites. Par exemple, le coût élevé de la synthèse des peptides standards (quand l'objectif est de mesurer la concentration de plusieurs dizaines de protéines). La SRM/MRM nécessite de sélectionner les couples ions parents et fragments les plus sensibles et spécifiques donnant des pics chromatographiques de bonne intensité, mais également d'optimiser l'énergie de collision pour chaque peptide. Les étapes d'optimisation de la méthode peuvent être un frein au passage de la phase de découverte à la validation des candidats. Enfin, à cause de sa faible résolution (4 000, Tableau 2), un quadripôle risque de sélectionner des précurseurs et fragments dont la masse est similaire à celle de la protéine cible

initiale. Cette contamination par des ions interférant peut alors conduire à des identifications de faux positifs ou à des imprécisions dans la quantification.

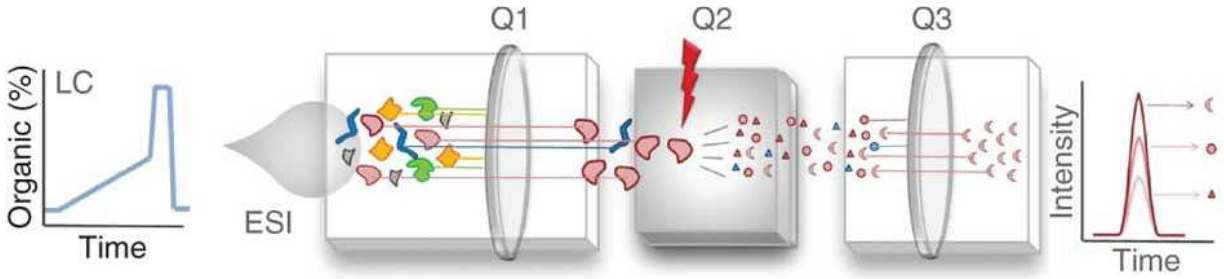


Figure 11 : Schéma d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle utilisé lors d'analyse SRM/MRM.
Le premier quadripôle (Q1) sélectionne l'ion précurseur d'intérêt, qui sera fragmenté par le deuxième quadripôle (Q2).Les ions de transition sélectionnés pour l'analyse sont sélectionnés par le troisième quadripôle (Q3) et analysés. D'après (Picotti et Aebersold, 2012)

2.2.2.3 Phase validation : PRM

2.2.2.3.1 Définition

Le PRM est un type d'analyse dérivée de la SRM/MRM pour la quantification de peptides dans des mélanges complexes. Le principe de base du PRM est le même que pour la SRM/MRM, sauf que les ions fragments issus de l'ion précurseur, ne sont pas filtrés et analysés dans le troisième quadripôle mais analysés sans filtre dans un analyseur à haute résolution de type Orbitrap ou TOF (Figure 12) (Peterson et al., 2012). Le filtre appliqué par le quadripôle permet une sensibilité un peu supérieure à celle de l'Obritrap, mais ce dernier va pouvoir compenser ce défaut grâce à une haute résolution (jusqu'à 60 000 de résolution à un ratio *m/z* de 200) et à une bonne précision de masse (inférieure à 5 ppm).

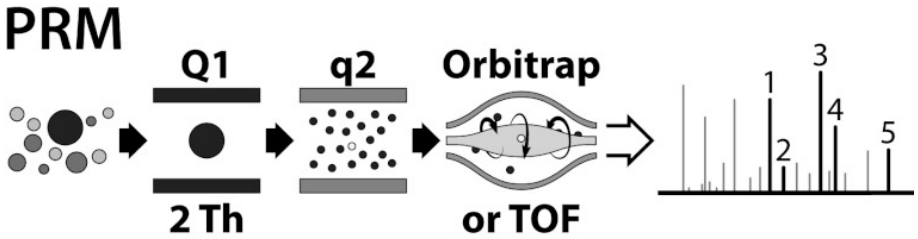


Figure 12 : Représentation schématique des analyses par PRM réalisées sur LTQ-Orbitrap ou Q-TOF.
L'ion précurseur d'intérêt est sélectionné dans le Q1, puis fragmenté dans le q2 et analysé dans l'Orbitrap ou le TOF (Peterson et al., 2012).

2.2.2.3.2 Instruments

Le grand avantage de l'analyse PRM est qu'elle peut être mise en place sur certains instruments qui sont utilisés pour les analyses à haut débit telles que les hybrides quadripôle-TOF ou quadripôle-Orbitrap (Peterson et al., 2012). La technique repose toujours sur une sélection des ions parents par le quadripôle, mais tous les ions fragments obtenus sont analysés par le TOF ou l'Orbitrap. L'analyse PRM ne nécessite donc pas de connaissances autres que la masse de l'ion parents et son temps de rétention pour réaliser une analyse de protéomique ciblée. Les informations des transitions d'intérêt peuvent alors être extraites par un logiciel et obtenir un pic chromatographique, comme en SRM/MRM. La quantification s'effectue de manière similaire, par ajout d'une quantité connue des peptides lourds correspondant aux peptides des protéines d'intérêt.

La précision de masse de l'appareil permet de pallier le problème de l'interférence des ions fragments de masse similaire qui co-éluent, qui pouvait avoir lieu avec l'analyse SRM/MRM. Le fait de suivre tous les ions fragments, et pas que les 3-5 meilleures transitions comme en SRM/MRM, va améliorer la fiabilité de l'identification des peptides. Ces instruments qui ont la capacité de réaliser les analyses à haut débit dans les phases de découverte, peuvent se révéler plus simples pour sélectionner les peptides d'intérêt des biomarqueurs candidats.

L'Orbitrap présente un inconvénient qui est intrinsèque à son architecture. En effet, il accumule les ions et plus la concentration de l'analyte est faible, plus le temps d'accumulation des ions sera élevé. Cela a pour conséquence de diminuer le nombre de « points d'analyse » pour un ion, et risque de limiter le nombre d'ions précurseurs qui peuvent être analysés en parallèle (Peterson et al., 2012).

2.2.2.4 Phase validation DIA

2.2.2.4.1 Définition

Les méthodes de protéomique à haut débit et de protéomique ciblée présentées jusqu'à présents sont dites « data dependent analysis » (DDA). Elles nécessitent la détection des ions précurseurs détecté lors d'un scan général (appelé Full MS), la sélection des ions précurseurs de

plus forte intensité, leur fragmentation et la détection d'un spectre de masse de tous les ions fragments (MS/MS). Les méthodes à haut débit sont limitées par leur capacité de quantification des protéines sur des échantillons très abondants. De plus, la protéomique ciblée est limitée par la mesure de quelques milliers de transitions par analyse (Gillet et al., 2012).

Afin de pallier ces limites, des méthodes dites « data independent analysis » (DIA) ont été développées. Elles ne nécessitent ni la détection, ni la connaissance des ions précurseurs pour déclencher la fragmentation et l'acquisition des données d'ions fragments. Elles fonctionnent de manière cyclique, le long de l'analyse chromatographique, par la sélection d'ions précurseurs dans des fenêtres de masses prédéfinies (de quelques daltons à l'ensemble) et consécutives, puis par la fragmentation de l'ensemble de ces ions et enfin, par l'acquisition du spectre de fragmentation (Figure 13) (Gillet et al., 2012). Ces méthodes ont juste besoin de l'information sur le lien entre les fragments et leur ion précurseur.

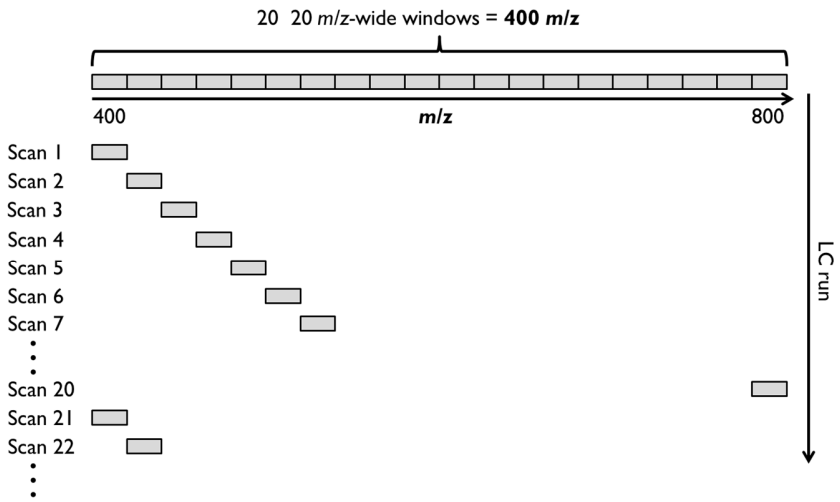


Figure 13 : Représentation schématique d'une analyse DIA sur une fenêtre de 20 m/z.
Lors du premier scan, les ions de plus de 400 m/z mais inférieurs à 425 m/z (dans cette configuration) sont sélectionnés et fragmentés tous ensembles. Le scan répètera cette opération sur la fenêtre de masse 425-450 m/z et ainsi de suite tout le long de la chromatographie. Adapté du webinar Skyline 2 par Brendan Maclean : https://skyline.gs.washington.edu.

2.2.2.4.2 Instruments

Lors d'une acquisition de type DIA, le premier quadripôle filtre les ions précurseurs entrant dans une première fenêtre de masse de 25 Da (400-425 m/z par exemple) et les envoie dans la cellule de collision. Les ions fragments résultant sont analysés dans le TOF ou l'Orbitrap afin

d'obtenir le spectre de fragmentation de l'ensemble des ions précurseurs. Ainsi de suite, le premier quadripôle filtre les ions précurseurs entrant dans la fenêtre de masses suivantes.

Malgré la complexité des spectres obtenus, il est possible d'extraire l'information des spectres de fragmentation afin d'obtenir des pics chromatographiques et de réaliser une quantification semblable à celle réalisée en SRM/MRM (Gillet et al., 2012). De plus, à l'inverse du SRM/MRM ou du PRM, les données de DIA correspondent à des enregistrements sans *a priori* de l'ensemble des ions présents dans un échantillon, et qui peuvent être ré-analysés *in silico* pour en extraire l'information d'un résidu modifié par exemple.

Un des inconvénients de cette technique est son incompatibilité avec les méthodes standards d'interrogation des bases de données, malgré les efforts de plusieurs équipes qui se concentrent pour créer des approches informatiques dédiées (Tsou et al., 2015).

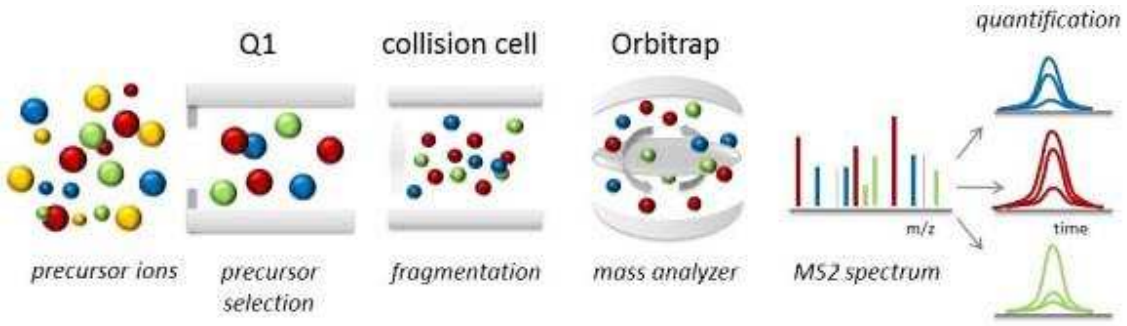


Figure 14 : Représentation schématique d'une analyse DIA réalisée sur LTQ-Orbitrap. Adapté de http://www.biognosys.ch/technology/hrm.html.

2.3 Composition des liquides biologiques

2.3.1 Le sang

Le sang est un des liquides biologiques les plus analysés du fait de sa pratique courante dans la prise en charge habituelle des patients. Dans le cadre de la recherche de biomarqueurs, le sang prélevé doit être traité rapidement par centrifugation pour obtenir le sérum ou le plasma. Le plasma est obtenu après collection du sang dans un tube contenant un anticoagulant (de type héparinate, EDTA ou citrate). Le sérum est quant à lui obtenu après coagulation du sang collecté

dans un tube, sans anticoagulant (Hu, Loo, et Wong, 2006). Le sérum possède globalement la même composition que le plasma, en dehors du fait qu'il ne contient plus de fibrinogène (suite à la coagulation du sang) (Anderson et Anderson, 2002). Parfois utilisé de manière interchangeable dans les essais concernant les biomarqueurs, l'HUPO (Human Proteome Organization) standardise les étapes pré-analytiques pour les études protéomiques et recommande l'utilisation du plasma (Omenn et al., 2005). En effet, l'analyse du plasma s'est révélée plus reproductible que celle du sérum du fait de la variabilité du processus de coagulation. Il est cependant à noter que pour certaines études rétrospectives, l'utilisation du sérum était la seule possibilité d'étude car le plasma est moins souvent stocké dans les biobanques (Omenn et al., 2005).

Les protéines sériques ou plasmatiques peuvent être classées en trois groupes :

1) Les protéines secrétées, qui peuvent exister sous plusieurs formes (en moyenne en 3 variantes) avec pour chacune des possibilités de clivage et de modifications post-traductionnelles différentes. La moitié de la masse protéique est représentée par une seule protéine, l'albumine qui est présente à une concentration d'environ 55 g/L chez l'adulte. Avec les 10 autres protéines les plus abondantes, ces protéines majoritaires constituent 90% de la masse protéique totale. En revanche, parmi les protéines de l'inflammation, les cytokines, par exemple l'interleukine-6 (Il-6) est présente à des concentrations de l'ordre de 1 à 5 pg/mL, soit un facteur 10^8 de différence par rapport à l'albumine.

2) Les protéines non secrétées, provenant du renouvellement des cellules des tissus, se retrouvent également sous différentes formes dans la circulation sanguine et à de faibles concentrations.

3) les immunoglobulines, près de 10 000 000 immunoglobulines différentes, sont présentes dans la circulation sanguine et reflètent « l'histoire » immunologique de chaque individu (Anderson, 2005).

Le sérum et le plasma sont donc caractérisés par une énorme variabilité dans le type de protéines, accompagnée d'une grande gamme dynamique en concentration de l'ordre de 10^{10}.

2.3.2 Les urines

L'urine est un liquide biologique très utilisé pour la recherche de biomarqueurs du fait de sa collection non invasive et en grande quantité. De plus, des études de profilage ont montré que le protéome urinaire était stable lorsque les urines sont conservées à 4°C jusqu'à trois jours (Schaub et al., 2004 ; Theodorescu et al., 2006).

Les urines contiennent des protéines solubles et un sédiment (phase solide).

1. Les protéines solubles urinaires proviennent en grande partie de la filtration du sang par le glomérule rénal. Les peptides et petites protéines (10 kDa) du sang circulant filtrent librement à travers le glomérule, tandis que celui-ci retient efficacement les protéines de haut poids moléculaire (>60 kDa). Cependant, dans certaines conditions physiologiques, une fraction de protéines abondantes du sang (comme l'albumine ou les immunoglobulines) parvient à traverser le glomérule rénal et est ensuite réabsorbée dans le tubule contourné proximal du rein (Christensen et Birn, 2001). Une modification dans la concentration urinaire des protéines peut alors résulter d'une variation de sa concentration sanguine, de sa filtration glomérulaire, ou de son processus de réabsorption dans le tubule proximal. Ces variations peuvent révéler différents processus pathologiques dans l'organisme en général (maladie systémique) ou au niveau du rein (maladie glomérulaire ou tubulaire, etc). Une étude a ainsi montré que sur les protéines retrouvées dans les urines, 49% sont des protéines solubles (H. Zhou et al., 2006).

2. Certaines des protéines solubles sont issues des cellules rénales. Par exemple, la THP (Tamm-Horsfall protein ou uromoduline) est une protéine issue du clivage protéolytique de son précurseur membranaire qui est exprimé dans la branche ascendante large de l'anse de Henlé où il se localise dans la membrane apicale des cellules tubulaires (Serafini-Cessi, Malagolini, et Cavallone, 2003). La THP est généralement la protéine urinaire la plus abondante, et par conséquent, elle peut interférer avec la détection d'autres protéines si elle n'est pas préalablement éliminée.

3. La phase solide des urines est constituée principalement de sédiments de haute densité composés de cellules épithéliales nécrosées et de cylindres urinaires, qui peuvent être isolés par des centrifugations à basse vitesse. Une augmentation du nombre de cellules ou des cylindres

peut être indicative de maladie rénale, et leur identification par microscopie optique peut être informative pour le diagnostic. Une autre partie de cette phase solide correspond à des débris membranaires ou petits fragments de membrane (ou des corps apoptotiques ?) issus de la desquamation des microvillosités ou de processus d'apoptose. Cette fraction insoluble peut être isolée par des centrifugations à vitesse moyenne, autour de 17 000 g (Vaidyanathan, 2015).

4. Cette phase solide des urines contient également des exosomes qui peuvent être isolés par des ultracentrigfugations (Pisitkun, Shen, et Knepper, 2004). Les exosomes urinaires représentent 3% des protéines urinaires et sont issus de l'ensemble des cellules du tractus urinaire (H. Zhou et al., 2006).

2.3.3 Lavage Broncho-alvéolaire

Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) sont collectés par lavage des lobes pulmonaires avec une solution saline au cours d'une fibroscopie bronchique. Le liquide recueilli est alors centrifugé pour obtenir un surnageant débarrassé des cellules et débris cellulaires (Meyer et al., American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease, 2012).

Le LBA est un mélange complexe des protéines provenant des cellules épithéliales ou de la diffusion (passive ou active) à travers la barrière alvéolo-capillaire (Nguyen et al., 2014). Les protéines les plus abondantes dans le LBA sont des protéines plasmatiques (par exemple : albumine, transferrine, alpha 1-antitrypsine, immunoglobulines A et G) qui peuvent provenir d'une diffusion à travers la barrière alvéolaire air-sang (Bell et al., 1981). La plupart des maladies pulmonaires interstitielles sont caractérisées par une augmentation du passage des protéines plasmatiques dans le LBA suite à une perméabilité accrue de la barrière par lésion ou inflammation (Bowler et al., 2004 ; Noël-Georis et al., 2001).

Le LBA contient également des protéines associées au surfactant pulmonaire (SP-A, SP-B, SP-D), des protéines des cellules de club (CC-16, CC-10) et des antigènes associés aux mucines qui sont principalement sécrétées par les cellules des voies respiratoires et les cellules épithéliales alvéolaires (Hermans et Bernard, 1999).

2.4 Protéomique des liquides biologiques

2.4.1 Sérum/plasma

2.4.1.1 Protéomique descriptive

Une des premières études de recherche de biomarqueurs dans le sérum a été réalisée dès 2002 en comparant les échantillons de sérum provenant de patientes atteintes de cancer de l'ovaire à des sujets sains. L'analyse par SELDI-TOF a permis de mettre en évidence un panel de biomarqueurs ayant une sensibilité de 100% et une spécificité de 95% (Petricoin et al., 2002). La même année, une autre étude utilisant la MS en tandem a été publiée (Adkins et al., 2002) et dans laquelle les auteurs ont préalablement traité les échantillons de sérum par une déplétion des immunoglobulines avant de digérer les protéines par de la trypsine, et ont analysé les échantillons ainsi préparés par chromatographie couplée à un spectromètre de masse trappe à ions. Cette méthode a permis l'identification de 490 protéines sériques comme biomarqueurs potentiels. Une méthode similaire a été utilisée en 2003, sur le protéome de bas poids moléculaire du sérum, sans déplétion préalable. Les auteurs sont parvenus à identifier les peptides de 340 protéines, dont aucun ne provient de l'albumine, attestant bien l'enrichissement des protéines de bas poids moléculaires dans l'échantillon (Tirumalai et al., 2003).

Les méthodes de séparation des peptides par chromatographie liquide par échange ionique ou par électrophorèse de type IEF (Isoélectrofocalisation, séparation selon le point isoélectrique), couplées à l'analyse des peptides tryptiques par MS/MS, ont permis d'augmenter le nombre des protéines identifiées dans le plasma (Shen et al., 2004) ou dans le sérum (Chan et al., 2004). En 2004 et 2005, le développement de la CE-MS a permis la détection de plus de 1000 peptides habituellement présents dans le sérum (Kaiser et al., 2004 ; Sassi et al., 2005). En 2005, les résultats du projet Human Plasma Proteome Project (HPPP) lancé par le groupe HUPO en 2002, ont été publiés. L'objectif était essentiellement de créer une base de données contenant les protéines présentes dans le plasma humain. La participation de 35 laboratoires a permis d'obtenir 18 jeux de données ayant amené à l'identification de 3020 protéines avec au moins deux peptides (Omenn et al., 2005). De manière similaire, en 2011, l'ISB (Institute for Systems Biology) a publié

les derniers résultats du groupe Human Plasma Peptide Atlas, dont le but est de compiler les résultats de 91 études par MS en tandem sur les protéines plasmatiques. Un total de 20 433 peptides ont été identifiés, correspondant à 1 929 protéines (Farrah et al., 2011).

2.4.1.2 Exemples de biomarqueurs du sérum/plasma

Le profilage protéique différentiel du sérum/plasma a été réalisé par plusieurs équipes dans de la recherche de biomarqueurs de diverses pathologies telles que le cancer colorectal (Chen et al., 2004), le cancer de l'estomac (Ebert et al., 2004), les cancers des voies aérodigestives supérieures (Cheng et al., 2005), la maladie d'Alzheimer (Lopez et al., 2005), la polyarthrite rhumatoïde (de Seny et al., 2005 ; de Seny et al., 2008) ou la sclérose en plaque (Sawai et al., 2010).

Les protéomes de bas poids moléculaires sériques de 15 patients atteints de la maladie de Crohn ont été comparés à ceux de 48 sujets sains. L'analyse par ESI-QTOF a permis aux auteurs d'identifier le fibrinopeptide A, des peptides du complément 3 et de l'apolipoprotéine A-IV qui étaient plus exprimés chez les patients par rapport aux témoins. Ils ont ensuite montré par MALDI-TOF que ces peptides permettaient de différencier les patients atteints de maladie de Crohn de témoins, ainsi que de patients atteints de maladie inflammatoire chronique intestinale (Nanni et al., 2009).

Une analyse par LTQ-Orbitrap du protéome du plasma a comparé un groupe de 100 femmes atteintes de cancer du sein à celui de 100 femmes saines. Les auteurs ont identifié 1249 protéines différentielles. Ils en ont isolé un panel de 32 protéines par quantification label-free qui permet de discriminer les patientes atteintes des sujets sains (Zhang et al., 2013).

Les protéines sériques peuvent également être marquées par iTRAQ afin de réaliser une comparaison d'un maximum de huit échantillons en parallèle. Ce type d'analyse a été réalisé pour comparer des patients atteints de sclérose en plaque à un stade bénin par rapport à un stade agressif. L'analyse des échantillons par MALDI-TOF/TOF a révélé l'expression différentielle de 11 protéines. Ces protéines sont en relation avec l'opsonisation et l'activation du complément,

processus associés aux anomalies de la myélinisation de la sclérose en plaque (Tremlett et al., 2015).

2.4.1.3 Protéomique ciblée du sérum/plasma

Une équipe de l'Université de Washington a réalisé la quantification par label-free des protéines du sérum provenant de deux cohortes : l'une de 97 patients présentant un carcinome hépatocellulaire et l'autre de 108 patients atteints de cirrhose (Tsai et al., 2015). L'analyse protéomique a révélé un panel respectivement de 231 et 227 protéines sériques caractéristiques de chaque cohorte pour un total de 101 protéines différentiellement exprimées. Les auteurs ont ensuite réalisé une quantification relative de ces protéines candidates par SRM/MRM, et validé un panel de 21 protéines différentiellement exprimées.

D'autres équipes (Fortin et al., 2009 ; Lin et al., 2013) ont comparé les dosages classiques des protéines d'intérêt par ELISA aux résultats obtenus par MRM. Une excellente corrélation est observée avec $r^2 = 0,99$ entre les deux méthodes pour le dosage de la PSA (Prostate Specific Antigen) dans le sérum de patients atteints soit d'hyperplasie bénigne de la prostate, soit de cancer de la prostate. Lin et coll. (2013) ont comparé dans un groupe de patients atteints de cancer du côlon, les dosages plasmatiques par ELISA et par immuno-précipitation couplée à la MRM de six biomarqueurs candidats du cancer du côlon. Les auteurs ont observé une bonne corrélation entre ces deux techniques pour cinq des six protéines, validant l'intérêt de la MRM pour la quantification des protéines plasmatiques.

	Objectif	Type d'analyse	Résultat	Etude
Protéomique descriptive	Analyse protéomique	Déplétion des immunoglobulines, digestion trypsique et analyse MS/MS	Identification de 490 protéines	(Adkins et al., 2002)
	Analyse peptidomique	Analyse MS/MS	Identification de peptides de 340 protéines	(Tirumalai et al., 2003)
	Protéome plasmatique	Digestion trypsique puis chromatographie échangeuse de cation et analyse MS/MS	Identification de 1682 protéines	(Shen et al., 2004)

	Protéome sérique	Digestion trypsique puis isoélectrofocalisation et analyse MS/MS	Identification de 1444 protéines	(Chan et al., 2004)
	Analyse des polypeptides sériques	Ultrafiltration à 30 kDa puis analyse CE-MS	Jusqu'à 2000 polypeptides détectés	(Kaiser et al., 2004)
	Profiling des protéines <50 000 kDa	Analyse CE-MS	500 éléments du sérum ont été détectés	(Sassi et al., 2005)
	Human Plasma Proteome Project	Divers instrumets pour la MS/MS	Identification de 3020 protéines avec au moins deux peptides	(Omenn et al., 2005)
	Human Plasma Peptide Atlas	Les analyses nanoLC-MS/MS de 91 projets ont été interrogé en banque de données	20 433 peptides ont été identifiés, correspondant à 1 929 protéines	(Farrah et al., 2011)
Recherche de biomarqueurs	Cancer de l'ovaire	Analyse du sérum par SELDI-TOF	Panel de biomarqueurs ayant une sensibilité de 100% et une spécificité de 95%	(Petricoin et al., 2002)
	Cancer colorectal	Analyse du sérum par SELDI-TOF	Quatre pics de grande intensité sont sélectionnés comme potentielle empreinte pour le diagnostic	(Chen et al., 2004)
	Cancer de l'estomac	Analyse du sérum par SELDI-TOF	Une classification formée de 50 arbres de décision a permis l'identification des cancers	(Ebert et al., 2004)
	Cancers des voies aérodigestives supérieures	Analyse du plasma de 57 patients par MALDI-TOF	Six marqueurs différencient les patients atteints de cancer	(Cheng et al., 2005)
	Maladie d'Alzheimer	Analyse du sérum de 302 patients par MALDI-TOF	Un model "d'empreinte" peptidique a été construit pour le diagnostic	(Lopez et al., 2005)
	Polyarthrite rhumatoïde	Analyse du sérum de 103 patients par SELDI-TOF	Une empreinte de cinq peptides semblent de potentiels biomarqueurs	(de Seny et al., 2005)
	Sclérose en plaque	Analyse du sérum de 31 patients par SELDI-TOF	Un peptide fragment du complément C4 semble corrélé	(Sawai et al., 2010)
	Maladie de Crohn	Analyse peptidomique du sérum de 15 patients par nanoLC-MS/MS	Le fibrinopeptide A, complément 3 et l'apolipoprotéine A-IV semblent corrélés avec le diagnostic	(Nanni et al., 2009)

	Cancer du sein	Analyse du plasma de 100 patientes par nanoLC-MS/MS	Un panel de 32 protéines permet de discriminer les patientes des controles	(Zhang et al., 2013)
	Sclérose en plaque	Analyse du sérum de 7 patients par MALDI-TOF	A panel of 11 proteins	(Tremlett et al., 2015)
Protéomique ciblée	Cancer de la prostate	Comparaison du dosage ELISA et SRM/MRM	Validation du dosage du biomarqueur par SRM/MRM	(Fortin et al., 2009)
	Cancer du colon	Comparaison du dosage ELISA et SRM/MRM	Validation de cinq biomarqueurs connus	(Lin et al., 2013)
	Cirrhose	Analyse du plasma de 108 patients par nanoLC-MS/MS et validation par SRM/MRM	21 protéines sont différentiellement exprimées	(Tsai et al., 2015)

Tableau 3: Tableau récapitulatif des publications scientifiques sur la protéomique du sérum et plasma.

2.4.2 Urines

2.4.2.1 Protéomique descriptive

La première analyse des protéines urinaires a été réalisée en 2001 sur un spectromètre de masse Q-TOF et a permis l'identification de 115 protéines (Spahr et al., 2001). En 2004, les urines de 2 sujets sains ont été prétraitées par concentration en utilisant un filtre avec un seuil à 5 kDa, et par déplétion des immunoglobulines (Pieper et al., 2004). La séparation des protéines a été réalisée ensuite par chromatographie d'exclusion et finalement par électrophorèse bidimensionnelle. Après excision des bandes du gel 2D et digestion à la trypsine, un total de 150 protéines a pu être identifié par LC-MS/MS. D'autre part, le couplage de l'électrophorèse capillaire avec un instrument de type TOF a permis de comparer les profils protéiques des urines provenant de 57 sujets sains et de 44 patients atteints de différentes maladies (Weissinger et al., 2004). Le signal de 173 polypeptides a pu être détecté chez au moins 90% des sujets, et 690 dans au moins 50%.

En 2005, une équipe a réalisé le fractionnement des protéines urinaires selon 3 méthodes avant l'analyse par MS (Sun et al., 2005). Ces fractionnements ont permis l'identification de 226 protéines dont 171 n'avaient alors jamais été détectées dans les urines.

L'utilisation des spectromètres de masse à haute précision, les LTQ-Orbitrap et LTQ-FT-ICR a donné la possibilité au groupe de Matthias Mann, en 2006, d'identifier 1543 protéines à partir d'un pool d'urines de 9 sujets sains (Adachi et al., 2006).

En 2009, Kentsis et coll. (2009) ont réalisé une étude approfondie du protéome urinaire en analysant par LTQ-Orbitrap les protéines de haut et bas poids moléculaire ainsi que le sédiment précipitant à 210 000 g. Un total de 2362 protéines a pu être identifié, provenant de cellules de l'ensemble de l'arbre urinaire.

2.4.2.2 Exemples de biomarqueurs urinaires

Un groupe a réalisé le profilage des protéines de bas poids moléculaires de 21 sujets avec des pathologies bénignes et 26 atteints d'un cancer de la prostate par CE couplé à un ESI-TOF (Theodorescu et al., 2005). Les auteurs ont pu alors établir un panel de 15 polypeptides permettant d'identifier des patients atteints de cancer de la prostate.

Un autre groupe a réalisé le profilage des protéines et peptides urinaires par SELDI-TOF, chez 206 femmes enceintes classées en sept groupes selon la gravité de la pré-éclampsie (Buhimschi et al., 2008). Treize pics ont été sélectionnés permettant d'identifier les patientes pour lesquelles il serait nécessaire de déclencher l'accouchement. Grâce à une analyse par Q-TOF, les auteurs ont réussi à identifier cinq des pics candidats biomarqueurs comme étant des fragments protéolytiques spécifiques de l'albumine et de l'alpha-1-antitrypsine.

En 2009, Quintana et coll.,(2009) ont utilisé une approche originale pour analyser le peptidome urinaire de patients présentant une dysfonction chronique du greffon rénal. L'analyse label-free a permis aux auteurs d'identifier deux ions ayant la meilleure capacité à discriminer les groupes patients des témoins. Les deux ions ont été ensuite identifiés en MS en tandem comme étant des fragments de THP et du kininogène. Des analyses par PRM ont été réalisées pour confirmer le potentiel diagnostique de ces deux ions.

La même année, l'analyse du protéome de bas poids moléculaire a été réalisée par CE-MS chez 324 individus sains ayant un âge compris entre 2 et 73 ans (Zürbig et al., 2009). Les auteurs

ont pu observer des modifications de sécrétion protéique pour 325 peptides parmi 5 000 détectés. Par la suite, l'identification de ces peptides par LTQ-Orbitrap a montré que la majorité de ces peptides sont des fragments de collagène α1 de type I et de THP.

La comparaison du peptidome urinaire de 379 sujets sains avec celui de 230 patients atteints de différentes maladies rénales chroniques a été réalisée par (Good et al., 2010). Cette étude a été réalisée par CE couplée à un MS de type ESI-TOF. De manière intéressante, les auteurs ont en plus analysé 20 échantillons par CE couplée à un FT-ICR afin de bénéficier de la précision de masse de cet instrument et re-calibrer leurs mesures. Cette stratégie a permis d'établir une liste de 634 peptides permettant de différencier les patients des sujets sains. L'analyse par Q-TOF ou LTQ-Orbitrap de ces 634 peptides a donné la possibilité d'en identifier 273 comme étant des fragments de collagène, protéines du sang, et des protéines rénales, probablement issues de la dérégulation de l'activité de protéases.

Chen et coll. (2010) ont comparé les urines de 12 sujets sains à celles de 23 patients atteints de cancer de la vessie. Les protéines urinaires des patients classés en trois groupes selon leur stade d'évolution et des témoins ont été mélangées pour chaque groupe, digérées et marquées par iTRAQ. Elles ont ensuite été analysées par LTQ-Orbitrap. L'analyse a permis l'identification de 578 protéines dont 506 ont été quantifiées et six, validées par western blot, sont retrouvées surexprimées chez les patients.

En 2012, Loftheim et coll. (2012) ont recherché par protéomique « shotgun », des marqueurs de rejet aigu de greffon rénal. Ils ont pour cela comparé les urines de six patients avec une greffe stable et les urines de 6 patients à deux temps, pendant une phase stable et au moment du rejet du greffon. Les protéines urinaires ont été analysées par chromatographie bidimensionnelle couplée à un LTQ-Orbitrap. Les auteurs ont identifié 11 protéines différentiellement surexprimées chez les patients présentant un rejet de greffe, en relation avec la croissance ou la réponse immunitaire.

2.4.2.3 Protéomique ciblée des urines

L'application des méthodes de protéomiques ciblées sur les urines a démontré la possibilité de réaliser la quantification absolue de 28 peptides correspondant à 10 protéines urinaires en une analyse de 60 minutes (Gallien et al., 2012). Les auteurs ont à la fois comparé les modes SRM/MRM des TQ et PRM des LTQ-Orbitrap, permettant d'obtenir une LOQ de 20 attomoles pour l'analyse PRM contre 160 pour la SRM/MRM.

Simon et coll. (2014), ainsi que Shi et coll. (2014) ont démontré la possibilité de réaliser dans les urines, la quantification absolue de la podocine et de la protéine AGR2 (anterior gradient 2), deux candidats biomarqueurs des lésions rénales et du cancer de la prostate.

La même année, Lacroix et coll. (2014) ont comparé les urines d'enfants atteints de néphropathie obstructive avec celles de témoins sains. L'analyse des urines par LTQ-Orbitrap a permis d'identifier la protéine arginase 1 comme permettant de différencier les patients des témoins. Les auteurs ont par la suite validé la surexpression de cette protéine par western blot ainsi que par SRM/MRM sur les urines.

	Objectif	Type d'analyse	Résultat	Etude
Protéomique descriptive	Protéome urinaire humain	Analyse nanoLC-MS/MS	Identification de 115 protéines	(Spahr et al., 2001)
	Protéome urinaire avec immunodéplétion	Chromatographie d'exclusion, electrophorèse bidimensionnelle et analyse nanoLC-MS/MS	Identification de 150 protéines	(Pieper et al., 2004)
	Analyse des urines de 57 controles et 44 patients divers	Analyse CE-MS	173 polypeptides détectés dans 90% des sujets, 690 dans au moins 50%	(Weissinger et al., 2004).
	Protéome urinaire humain	Analyse nanoLC-MS/MS, SDS-PAGE et nanoLC-MS/MS et 2D nanoLC-MS/MS	226 protéines identifiées dont 171 inédites	(Sun et al., 2005).
	Protéome urinaire humain à haut débit	SDS-PAGE et nanoLC-MS/MS	1543 protéines identifiées	(Adachi et al., 2006)
	Protéome, peptidome et sécrétome urinaire humain	SDS-PAGE des trois fractions protéiques, excision des bandes, digestion trypsique et analyse MS/MS	2362 protéines identifiées	(Kentsis et al., 2009)

Recherche de biomarqueurs	Profilage peptidomique du cancer de la prostate	Analyse CE-MS	15 polypeptides permettent d'identifier des patients atteints de cancer de la prostate	(Theodorescu et al., 2005)
	Profilage protéique des urines de 206 femme atteintes de pré-éclampsie	Analyse SELDI-TOF	Treize pics séparent les patientes qui nécessiteraient un déclenchement. Cinq sont des fragments de l'albumine et de l'alpha-1-antitrypsine	(Buhimschi et al., 2008)
	Peptidome urinaire de patients avec dysfonction chronique du greffon rénal	Analyse nanoLC-MS/MS, quantification label-free et validation par PRM	Deux ions, fragments de THP et du kininogène, discriminent les patients	(Quintana et al., 2009)
	Analyse du protéome de bas poids moléculaire en fonction de l'âge	Analyse CE-MS	325 peptides dérégulés parmi 5 000 détectés, la majorité sont des fragments de collagène α1 et de THP	(Zürbig et al., 2009)
	Peptidome urinaire de 230 patients atteints de différentes maladies rénales chroniques	Analyse CE-MS avec recalibration par FT-ICR	634 peptides différencient les patients, dont une majorité de fragments du collagène, protéines sanguines ou rénales	(Good et al., 2010)
	Protéome de 23 patients atteints de cancer de la vessie	Digestion trypsique, marquage iTRAQ puis analyse nanoLC-MS/MS	Six protéines, validées par western blot, sont retrouvées surexprimées	Chen et coll. (2010)
	Recherche de marqueurs de rejet aigu de greffon rénal chez six patients	Digestion trypsique, chromatographie 2D et analyse MS/MS	11 protéines sont surexprimées chez les patients	(Loftheim et al. 2012)
Protéomique ciblée	Quantification absolue de 28 peptides correspondant à 10 protéines urinaires	Comparaison des techniques de quantification absolues par SRM/MRM et PRM	LOQ de 20 attomoles pour l'analyse PRM contre 160 pour la SRM/MRM	(Gallien et al., 2012)
	Quantification absolue de la podocine dans les urines	Digestion trypsique et analyse nanoLC-MS/MS en SRM/MRM	LLOQ de 0.39 ng/mL sur 1 mL d'urine	(Simon et al. 2014)
	Quantification absolue d'AGR2 dans les urines	Digestion trypsique et analyse nanoLC-MS/MS en SRM/MRM	L'analyse de 15 mL d'urine permet d'atteindre une LOQ de 10 pg par 100 pg de protéines totales	(Shi et al., 2014)
	Recherche de marqueurs de néphropathie obstructive chez des enfants	Analyse nanoLC-MS/MS, validation par Western Blot et SRM/MRM	La protéine arginase 1 comme permettant de différencier les patients des témoins	(Lacroix et al. 2014)

Tableau 4: Tableau récapitulatif des publications scientifiques sur la protéomique des urines.

2.4.3 Protéomique du lavage broncho-alvéolaire

Une des premières analyses protéomiques du LBA a été réalisée en 2001, avec la combinaison de l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle et par MALDI-TOF qui a permis d'identifier 49 protéines du LBA (Sabounchi-Schütt et al., 2001). En 2008, Chen et coll. (2008) ont analysé les protéines du LBA de six sujets sains non-fumeurs par LTQ-FT-ICR. Ils sont parvenus à identifier 167 protéines des LBA, dont 42 communes aux six sujets. La combinaison d'une chromatographie échangeuse de cations et de LC-MS/MS a donné la possibilité à (Gharib et al., 2009), de réaliser une analyse approfondie du protéome du LBA de quatre sujets sains et huit patients atteints de mucoviscidose (MV). Ils ont ainsi identifié 896 protéines, dont 459 avec au moins trois peptides. La catégorisation fonctionnelle et l'analyse des réseaux protéiques ont permis d'identifier des régulations différentielles de processus clés dont la réponse immunitaire et l'activité protéolytique, connus pour contribuer à l'évolution de la maladie pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. Finalement, en 2013, Nguyen et coll. (2013) ont analysé par LTQ-Orbitrap, les LBA de 5 sujets sains et 30 patients atteints de syndrome de détresse respiratoire aiguë. Ils ont réussi à identifier 1288 protéines, dont seules 184 sont communes à l'ensemble des individus et 76 surexprimées chez les patients, démontrant ainsi le potentiel des protéines du LBA pour le diagnostic de pathologies.

Objectif	Type d'analyse	Résultat	Etude
Analyse protéomique	Electrophorèse bidimensionnelle et MALDI-TOF	Identification de 49 protéines du LBA	(Sabounchi-Schütt et al., 2001)
Analyse protéomique du LBA de six témoins	Analyse LTQ-FT-ICR	Identification de 167 protéines du LBA	(Chen et al., 2008)
Analyse protéomique du LBA de huit patients MV	Chromatographie échangeuse de cations et analyse LC-MS/MS	Identification de 896 protéines	(Gharib et al., 2009)
Analyse protéomique du LBA de 30 patients MV	Analyse nanoLC-MS/MS	Identification de 76 potéines surexprimées chez les patients	(Nguyen et al., 2013)

Tableau 5: Tableau récapitulatif des publications scientifiques sur la protéomique du lavage broncho-alvéolaire.

2.5 Avantages et limites de la protéomique dans la recherche de biomarqueurs

Plusieurs approches peuvent être utilisées pour la recherche des biomarqueurs, incluant des approches de biochimie classique pour tester des candidats ou des approches de criblage à haut débit pour des recherches sans a priori.

La protéomique est une des approches globales les plus utilisées dans la recherche des biomarqueurs car elle permet de suivre simultanément plusieurs protéines lors d'une seule et même analyse. Au contraire du génome qui est une entité relativement constante, le protéome diffère de cellule à cellule et change constamment à travers des interactions biochimiques intracellulaires avec le génome et son environnement. Cette diversité est due à divers mécanismes post-traductionnels qui modifient les fonctions et les propriétés des protéines originelles. Un des grands avantages des approches protéomique par rapport aux autres approches « omiques » est la possibilité d'analyser la quantité de protéines réellement exprimées et leurs modifications post-traductionnelles.

Alors que le nombre de protéines que l'on est capable d'identifier ne cesse de croître, le nombre de protéines, candidates comme biomarqueurs qui ont trouvé leur chemin jusqu'à une utilisation en clinique reste faible. Une analyse *a posteriori* réalisée en 2007 a compilé les résultats de publications concernant les protéines différentielles dans des cas de cancer. Les auteurs ont obtenus une liste de 1261 protéines, au sein desquelles seules neuf ont été approuvées par la FDA (Food and Drug Administration aux Etats Unis) comme « antigènes associés à des tumeurs » (Polanski et Anderson, 2007).

La protéomique présente différents inconvénients intrinsèques à la technologie :

1. Tout d'abord la majorité des biomarqueurs sont des protéines de faible abondance, et leur détection est limitée par la sensibilité de la détection des techniques utilisées. De plus, pour la phase de découverte et de validation des biomarqueurs, il est important d'identifier les peptides spécifiques mais aussi de quantifier de manière précise ces peptides. Cette détection et quantification dans le cas d'ions en faible abondance peuvent se révéler

difficiles surtout à l'intérieur d'échantillons complexes contenant des protéines de forte abondance (comme Albumine, THP, etc) qui allongent le temps d'analyse par le spectromètre de masse.

2. La gamme dynamique des spectromètres de masse est limitée à 10^3-10^4, ce qui représente un problème majeur dans l'analyse du plasma et du sérum. L'écart entre les protéines les plus abondantes et les moins abondantes, est de l'ordre de 10^{10} dans ces liquides biologiques. Ainsi, malgré de nombreuses avancées, le protéome du sérum (ou plasma) fait encore face à plusieurs défis biologiques et techniques, la présence de sels et autres composés interférant, entrainant un risque de réactions croisées et surtout la grande variabilité inter- et intra-individuelle entrainant un manque de reproductibilité (Ray et al., 2011).

3. La standardisation des procédures de préparation des échantillons, des analyses MS et de l'analyse bio-informatique des données est indispensable. Notamment, pour l'analyse du LBA pour lequel subsiste un manque de concertation pour les méthodes de prélèvement et de préparation des protéines. D'autres limites sont imputables à la manipulation des échantillons avant même leur analyse. Les procédures de collection et de manipulation des échantillons affectent la sensibilité, la sélectivité et la reproductibilité de toutes analyses. Dans le contexte du sérum, par exemple, le contenant de recueil est de prime importance, car différents types de tubes de prélèvement vont affecter la qualité de l'échantillon, soit à cause du relargage de composés qui affecteront l'analyse MS, soit tout simplement parce que ce ne sont pas les mêmes protéines qui s'adsorbent dans le tube de prélèvement (Hsieh et al., 2006). Cette étude a également montré l'importance de la température et la durée de coagulation du sérum sur les résultats MS. Les conditions de stockage des échantillons sont aussi essentielles pour l'analyse protéomique. Les échantillons de sérum doivent être conservés au plus à -70°C, en aliquotes afin d'éviter des étapes de congélation/décongélation qui seraient dégradantes. Pour finir, la durée du stockage est

également décisive, il y aurait des risques d'induire des artefacts lors de la recherche des biomarqueurs si l'échantillon a été stocké sur le long terme ou à des températures trop élevées, à cause de la dégradation progressive de protéines instables du sérum (Ahmad et al., 2009).

D'autre part, il y a eu dans ces études, plusieurs difficultés rencontrées par la communauté scientifique engagée dans la recherche de biomarqueurs, indépendamment des approches technologiques.

1. La classification des patients et le choix des sujets contrôles.

Malgré l'effort des chercheurs, peu de biomarqueurs et de techniques trouvent chemin jusqu'à l'utilisation clinique (Anderson, 2010). En effet, des études précliniques intéressantes ne se poursuivent pas parce qu'elles ne répondent pas aux mêmes exigences des essais cliniques mis en place à grande échelle. Tout d'abord, un plan d'expérience non optimal des études préliminaires peut amener à des résultats qui n'aboutiront pas à la validation des biomarqueurs candidats. Une fois l'établissement des techniques aboutissant à l'identification des biomarqueurs candidats, un processus minutieux doit être employé afin d'établir un bon plan d'expérience. Le protéome, qui est dynamique et reflète le statut physiologique d'un individu, est fortement influencé par une variété de facteurs environnementaux, cliniques et thérapeutiques, qui sont susceptibles d'influencer l'interprétation des résultats (Omenn et al., 2005). Pour obtenir des résultats significatifs et qui peuvent être extrapolés à l'ensemble de la population d'une étude, il est essentiel de prendre en compte ces considérations dès la conception de l'essai de manière à inclure des patients avec les contrôles appropriés, et classer les sujets selon des facteurs de risque bien définis (Ray et al., 2011).

2. Stabilité des prélèvements - variabilités intra- et inter-individuelle.

Les échantillons d'urines présentent plusieurs inconvénients qui limitent l'analyse protéomique des protéines solubles. En effet, la composition protéique des urines variable en

fonction de facteurs physiologiques ou pathologiques, mais également environnementaux. Ainsi, des facteurs tels que le régime alimentaire, l'hydratation, le rythme circadien, l'origine géographique, l'état métabolique ou encore l'activité physique peuvent entrainer des variations du protéome urinaire (Kohler, Schänzer, et Thevis, 2015 ; Uehara, Tominaga, et Shibagaki, 2014). D'après une étude récente, la plus grande variabilité dans le profil protéique urinaire est observée entre les mictions urinaires du matin et du soir (Becker et al., 2014). Ainsi, il faut prendre en compte les variations inter- et intra-individuelles dans l'étude du protéome urinaire, ce qui complique l'établissement des études cliniques. Certains de ces problèmes peuvent être résolus par la collection des urines de 24 heures (Rodby et al., 1995) (mais en pratique difficile de réalisation pour des sujets non hospitalisés) ou par l'utilisation de facteur de normalisation comme le dosage de la créatinine urinaire qui est le plus utilisé en clinique (Vestergaard et Leverett, 1958).

3 Exosomes des liquides biologiques

3.1 Intérêt des exosomes par rapport au liquide biologique

Au début des années 2000, des exosomes (nanovésicules) ont été mis en évidence dans le LBA (Admyre et al., 2003) et les urines (Pisitkun, Shen, et Knepper, 2004). Depuis, les exosomes ont été retrouvés dans la plupart des liquides biologiques comme le sang (Caby et al., 2005), la salive (Ogawa et al., 2011), le lait maternel (Admyre et al., 2007) ou encore le liquide amniotique (Asea et al., 2008).

L'intérêt pour ces nanovésicules n'a pas cessé de croitre depuis une décennie. Cet intérêt peut s'expliquer par un certain nombre d'avantages qu'ils présentent par rapport aux liquides biologiques entiers :

- les changements physiologiques opérés au sein de leur cellule d'origine se retrouvent dans leur contenu (Hong et al., 2009 ; Skog et al., 2008). Les exosomes issus des liquides biologiques représentent ainsi un excellent réservoir de biomarqueurs. Ils contiennent une sous population de protéines, ARNm, microARN et lipides spécifiquement intégrés lors de leur genèse comme décrit dans le chapitre précédent (Raimondo et al., 2011 ; Simpson, Jensen, et Lim, 2008). Cette intégration spécifique permet un enrichissement de certains marqueurs cellulaires, qui sont habituellement présents en trop faible quantité pour être détectés dans les liquides biologiques (H Zhou et al., 2006). L'analyse des exosomes à partir des liquides biologiques pourrait s'assimiler à des « biopsies liquides », apportant des informations complémentaires aux examens classiques de la prise en charge de certaines maladies (Santiago-Dieppa et al., 2014 ; Yoshioka et al., 2014).

- Les exosomes constituent une sous-population des protéines présentes dans le liquide biologique, ce qui réduit la gamme dynamique des protéines présentes. De plus, des études analysant le contenu protéique des exosomes ont montré qu'ils sont constitués de protéines provenant des endosomes, de la membrane plasmique et du cytosol, mais assez peu d'autres organites intracellulaires, confirmant que les exosomes représentent

un compartiment subcellulaire spécifique (Théry et al., 2001). Deux bases de données sont disponibles afin que tout chercheur puisse partager les résultats obtenus sur des vésicules extra-cellulaires issues de tous types cellulaires ou liquides biologiques : Vesiclepedia (Kalra et al., 2012) et EVpedia (Kim et al., 2015).

- A partir des exosomes, il est possible d'obtenir une information très spécifique des types cellulaires dont ils sont issus. Les liquides biologiques contiennent des exosomes sécrétés par les cellules de tous les organes que celui-ci traverse. Il est possible d'enrichir les exosomes d'un organe en particulier (par immuno-précipitation avec un anticorps dirigé contre un marqueur spécifique d'un type cellulaire ou d'un organe (Prunotto et al., 2013). La bicouche lipidique qui entoure leur contenu permet de protéger les acides nucléiques (Good et al., 2007 ; Lv et al., 2013) et les protéines (H. Zhou et al., 2006) de leur dégradation, leur conférant donc une bonne stabilité.

La préparation et l'analyse des exosomes issus de liquides biologiques présentent cependant certaines limites. Afin de diminuer l'interférence de protéines fortement abondantes sur le rendement de l'isolement des exosomes ou sur l'analyse protéomique en elle-même, des étapes de purification sont régulièrement testées et publiées. Ces étapes supplémentaires vont ajouter un risque d'introduction d'un biais associé aux manipulations successives de l'échantillon, et conduisant à une plus grande variabilité inter- et intra-individuelle. Parmi les méthodes d'isolement des exosomes (détaillées chapitre 3.2), celle qui est le plus couramment utilisée passe par l'ultracentrifugation du liquide biologique. Bien que permettant de traiter un volume relativement important de liquide, elle est très chronophage. Cette étape rend difficile la mise en place d'une analyse à haut débit sur de nombreux échantillons qui proviennent de protocoles cliniques ou de la prise en charge classique hospitalière. En outre, il manque une homogénéisation des méthodes de collection des liquides, d'isolement des exosomes et d'analyses protéomique des exosomes. Beaucoup de protocoles différents sont utilisés et publiés, compliquant les comparaisons d'études. De plus, deux groupes ont montré l'influence des méthodes sur les contenus protéiques (protéines ou acides nucléiques) des exosomes provenant d'une même collection d'un milieu ou liquide biologique (Alvarez et al., 2012 ; Tauro et al., 2012).

3.2 Isolement des exosomes

3.2.1 Isolement des exosomes à partir du sérum/plasma

Le premier protocole d'isolement des exosomes du plasma a été publié en 2005 par Caby et coll. (2005) Les auteurs ont réalisé deux centrifugations séquentielles à vitesse faible (500 g) et modérée (12 000 g) sur le plasma, avant de le soumettre à une ultracentrifugation à 110 000 g pendant 2h. Les culots obtenus ont été passés sur filtre à 0,22 µm et traités par ultracentrifugation 2 fois à 110 000 g pendant 1h afin d'éviter un maximum de contamination par les protéines abondantes du plasma. Les protocoles d'isolement par centrifugations différentielles qui ont été utilisés par la suite sont des variations de ce premier protocole, avec deux ultracentrifugations mais à plus grande vitesse (Tomlinson et al., 2015 ; Wahlgren et al., 2012) ou encore une seule ultracentrifugation à plus grande vitesse (Aoki et al., 2014 ; Kahlert et al., 2014). Une combinaison d'ultracentrifugation et de chromatographie d'exclusion a également été publiée (Hong et al., 2014).

Des industriels ont mis à disposition des réactifs d'isolement des exosomes à partir de liquides biologiques comme par exemple l'ExoQuick-TC™ (System Biosciences). Ce coffret permet la précipitation des exosomes à partir d'un faible volume d'échantillon, rapide à mettre en place et facile à adapter pour des volumes plus grands si nécessaire. Ces méthodes de précipitation ont été utilisées par plusieurs groupes afin d'isoler les exosomes de sérum (Alegre et al., 2014 ; Vargas et al., 2014) ou de plasma (Cazzoli et al., 2013). D'après une étude comparant les différentes méthodes d'isolement des exosomes, ces techniques de précipitation semblent permettre de récupérer une grande quantité d'exosomes. Cependant des protéines fortement abondantes semblent co-précipiter, limitant l'usage de ces techniques à l'analyse des ARNm et microARN exosomaux (Alvarez et al., 2012). La précipitation par ExoQuick-TC ne représente donc pas une méthode simplifiée valable pour l'analyse des protéines exosomales.

Deux études récentes ont été publiées, présentant des méthodes d'isolement et de caractérisation des exosomes du sérum (Kanwar et al., 2014) ou du plasma (He et al., 2014) via des puces fonctionnalisées avec des anticorps dirigés contre des marqueurs membranaires spécifiques des exosomes. Ces méthodes semblent être rapides et faciles à mettre en place, sur

de faibles volumes d'échantillon. Leur utilisation n'est pour l'instant pas assez répandue pour remplacer les méthodes précédemment citées.

3.2.2 Isolement des exosomes urinaires

Plusieurs protocoles d'isolement des exosomes urinaires ont été publiés, et ils peuvent être classés selon le principe biochimique de la purification : ultracentrifugation, filtration ou immuno-capture.

1. Ultracentrifugation. Une centrifugation à « basse vitesse » (17 000 g) des urines est nécessaire pour éliminer les sédiments et autres débris cellulaires suivi d'une ultracentrifugation à 200 000 g pour isoler les exosomes du surnageant (Pisitkun, Shen, et Knepper, 2004). Ce protocole a permis aux auteurs d'isoler des nanovésicules et de valider l'enrichissement par microscopie électronique, immuno-détection et MS. Cependant, la protéine la plus abondante des urines, la THP, est toujours présente en très grande quantité. La THP est une glycoprotéine de 75 kDa (Lin et al., 2013), qui forme des filaments *via* des ponts disulfures entre ses monomères, ce qui a pour conséquence de la faire co-précipiter avec les exosomes, et risque également de diminuer le rendement de l'enrichissement en exosomes (Pressac, 2000). C'est pourquoi le même groupe a publié deux évolutions de son protocole afin d'en améliorer le rendement. Après ultracentrifugation, le culot d'exosomes est traité avec du dithiothréitol (DTT) afin de réduire les ponts disulfures de la THP et pour que celle-ci reste en monomères dans le surnageant lors d'une deuxième ultracentrifugation (Gonzales et al., 2009). La deuxième évolution a été l'addition de DTT plus précocement dans le traitement de l'échantillon, sur le culot obtenu à basse vitesse (17 000 g) afin de récolter des exosomes qui auraient été piégés dans les filaments de THP (Fernández-Llama et al., 2010). Ces méthodes de préparation des exosomes par ultracentrifugation ont pour avantage d'être relativement faciles à mettre en place et de permettre de manipuler des grands volumes (jusqu'à 160 mL pour un rotor type 70Ti Bekman Coulter par exemple). Cependant les ultracentrifugeuses ne sont pas des instruments disponibles couramment en clinique et nécessitent des temps de préparation relativement longs.

Une deuxième méthode basée sur l'ultracentrifugation utilise un gradient de sucrose dans de l'eau lourde (D_2O). Après une première centrifugation à 150 000 g, les exosomes sont déposés sur le haut d'un gradient de 5 à 30% de sucrose, et centrifugé à 200 000 g pendant 24h. Pour finir, chaque fraction est diluée et centrifugée à 150 000 g pendant 1h (Hogan et al., 2009). Cette méthode peut être simplifiée en réalisant un double coussin de sucrose dans de l'eau lourde D_2O. Les exosomes issus de la première ultracentrifugation sont déposés sur 2 couches de sucrose de densité différentes et centrifugés 3h à 110 000 g. Comme pour un gradient, les 2 couches sont collectées et à nouveau ultracentrifugées pour collecter les exosomes. Ces méthodes ont pour avantage d'éviter la co-purification de vésicules plus grosses et de la THP, et donc d'avoir un meilleur enrichissement en exosomes. Cependant, ce sont des méthodes qui prennent beaucoup de temps, qui nécessitent toujours une ultracentrifugeuse et qui ne permettent pas de préparer de nombreux échantillons en parallèle (Raj et al., 2012). D'autres techniques moins répandues, sont utilisées pour l'isolement des exosomes urinaires, telles que la purification des exosomes après ultracentrifugation ou par chromatographie d'exclusion stérique. Cette technique sépare les vésicules des protéines de haut poids moléculaire, permettant une meilleure identification des protéines exosomales. Cependant, cette technique est plus longue que l'ultracentrifugation et plus difficile à mettre en place (Rood et al., 2010).

2. Filtration. Plusieurs équipes ont essayé de développer des méthodes d'isolement basées sur la filtration ou la dialyse afin d'avoir des protocoles plus rapides et faciles à mettre en place. Après centrifugation des urines à 17 000 g, le surnageant est déposé sur des concentrateurs à nanomembrane de polyethersulfone, avec des pores d'un diamètre moyen de 13 nm pour un seuil de filtration à 100 kDa, et centrifugé jusqu'à 30 minutes à 3 000 g (Cheruvanky et al., 2007). Ceci permet un enrichissement grossier en grosses protéines et en vésicules de plus de 13 nm de diamètre. L'avantage de cette technique est sa rapidité, avec une concentration des protéines en 30 minutes seulement, et le faible volume d'urines qui peut être traité. La contrepartie de cette rapidité est qu'il s'agit d'un enrichissement très grossier en vésicules, et que cela pourrait limiter la détection de protéines faiblement abondantes lors d'analyse à haut débit, surtout dans le cas des maladies rénales avec protéinurie importante (Rood et al., 2010). Récemment, Musante et

coll. (2014) ont publié une méthode de préparation des exosomes urinaires par dialyse des urines avec une membrane avec un seuil de filtration à 1 000 kDa. Cette technique semble permettre l'isolement des vésicules extracellulaires urinaires en s'affranchissant des protéines contaminantes. Cette méthode n'a cependant pas encore été testée dans le cas d'analyse à haut débit.

3. « L'immuno-capture ». Les exosomes isolés à partir des urines ont été sécrétés par l'ensemble des cellules du tractus urinaire, faisant face à l'espace urinaire. Ces exosomes possèdent donc les marqueurs membranaires spécifiques de membrane apicale de ces cellules. Ces caractéristiques offrent la possibilité de réaliser un enrichissement d'exosomes provenant d'un segment spécifique de l'arbre urinaire par immuno-précipitation de vésicules (Prunotto et al., 2013). Cette méthode va permettre d'obtenir des fractions d'exosomes provenant de segments particuliers. L'analyse de ces exosomes peut ainsi être très informative dans des pathologies impliquant ces segments. En revanche cette méthode est assez longue à appliquer et nécessite une assez grande quantité d'anticorps (800 µg).

3.2.3 Isolement des exosomes à partir du LBA

Les exosomes du LBA ont été isolés pour la première fois en 2003 par ultracentrifugation et filtration (Admyre et al., 2003). Après filtration et centrifugation à 400 g afin d'éliminer les débris cellulaires et le mucus, les LBA sont centrifugés à 3 000 g puis 10 000 g avant d'être ultracentrifugés à 110 000 g pendant 1h (Torregrosa Paredes et al., 2012). Par la suite, d'autres études ont été publiées utilisant des méthodes avec une filtration à 0,22 µm supplémentaire pour éliminer les microvésicules de trop grand diamètre, avant d'ultracentrifuger à 140 000 g pendant 2h (Levänen et al., 2013 ; Qazi et al., 2010) ou à 120 000 g pendant 1h30 (Rodríguez et al., 2014).

3.3 Protéomique des exosomes

Plusieurs études ont été réalisées sur des exosomes issus de différents liquides biologiques. En 2007, Admyre et coll. (2007) ont isolé des nanovésicules du lait maternelle de

sujet sains par ultracentrifugation, ils ont identifié des protéines classiquement associées aux exosomes par spectrométrie de masse, données confirmées par western blot réalisés avec des anticorps dirigés contre HLA-DR, Hsc70, et CD81. De manière similaire, Gonzalez-Begne et coll. (2009) ont isolé les exosomes de la salive par ultracentrifugation et ils ont identifié 491 protéines, dont 265 ont été identifiées précédemment dans des études protéomiques sur la salive. Les exosomes de la prostate ont été étudiés dans le liquide séminal de trois volontaires sains (Poliakov et al., 2009). L'isolement basé sur ultracentrifugation et gradient de sucrose a permis l'identification de 440 protéines. Choi et coll. (2011) ont analysé les exosomes de l'ascite de patients atteints de cancer colorectal. L'ascite est un épanchement liquidien qui est un indicateur de mauvais pronostic. Les auteurs ont isolé les exosomes en combinant deux ultracentrifugations sur coussin de sucrose, puis une ultracentrifugation. Un total de 846 protéines a été identifié par spectrométrie de masse. Plusieurs protéines identifiées dans cette étude ont été précédemment décrites comme intervenant dans la pathophysiologie de la maladie, démontrant le potentiel des exosomes dans l'analyse de ce type de maladie.

Il est intéressant de noter qu'aujourd'hui, il n'existe aucune analyse protéomique à haut-débit qui ait été réalisée sur les exosomes du lavage broncho-alvérolaire. De plus, si les exosomes de plusieurs liquides biologiques ont été étudiés telle que la salive ou le lait maternelle, la plupart des études se sont focalisées sur le plasma et les urines.

3.3.1 Protéomique des exosomes du sérum/plasma pour la recherche des biomarqueurs

3.3.1.1 Protéomique descriptive

Plusieurs groupes ont cherché à réaliser l'analyse protéomique des exosomes du plasma. En 2009, Looze et coll. (2009) ont isolé les exosomes du plasma par centrifugation sur gradient de sucrose continu. Puis les fractions de densité 1,08–1,15 g/mL correspondant aux exosomes, ont été collectées puis ultracentrifugées à 175 000 g pendant 2h. Les protéines exosomales ont été séparées par SDS-PAGE, digérées et analysées par CLHP couplée à un LTQ-IT. Les auteurs ont identifié 66 protéines, dont la plupart pour la première fois décrites dans les exosomes du plasma. De manière similaire, Bastos-Amador et coll. (2012) ont d'abord isolé les microvésicules du

plasma, puis ultracentrifugé sur un gradient de sucrose avant de réaliser une dernière ultracentrifugation. La morphologie des exosomes a été validée par microscopie électronique. L'identification est réalisée par la mise en évidence de marqueurs membranaires tels que la Flotilline et le CD63, qui sont ensuite validés par western blot. Les protéines exosomales ont été analysées par UPLC couplée à un Q-TOF. Les auteurs ont détecté 161 protéines dont 52 font partie de la famille des immunoglobulines. Ils ont également remarqué une grande variabilité entre les échantillons des différents donneurs. L'étude protéomique la plus récente, a été réalisée par Kalra et coll. (2013). Les auteurs ont isolé les exosomes du plasma par trois méthodes différentes : ultracentrifugation, immuno-affinité et séparation en gradient de sucrose. Ils ont séparés les protéines exosomales des trois méthodes par SDS-PAGE avant de les digérer et analyser par LTQ-Orbitrap. Les auteurs ont identifié un total de 213 protéines, dont seulement 30 sont communes aux trois méthodes d'isolement. La conclusion des auteurs est que les méthodes d'ultracentrifugation et d'immuno-affinité ne permettent pas d'éliminer complètement les protéines les plus abondantes du plasma. La séparation sur gradient de sucrose serait alors le meilleur moyen d'obtenir l'enrichissement des exosomes, bien que la méthode soit plus longue à réaliser.

3.3.1.2 Protéomique différentielle

Les exosomes issus du plasma de dix patients présentant une dilatation aortique supérieure à cinq centimètres ont été comparés à ceux de sujets sains appariés pour l'âge et le sexe. Les auteurs de cette étude ont réalisé une analyse par LTQ-Orbitrap du protéome exosomal, avec quantification par label-free. Ils ont établi un panel de cinq protéines significativement surexprimées chez les patients avec une dilatation aortique Martinez-Pinna et coll. (2014).

Une autre équipe a collecté les échantillons de plasma provenant de 45 patients ayant subi dans les six derniers mois un accident vasculaire cérébral lacunaire Datta et coll, (2014). Les 45 patients ont été classés en trois groupes selon les répercussions observées et comparés à 17 sujets sains. Les exosomes plasmatiques de chaque patient des quatre groupes ont été isolés, mélangés selon les groupes définis et séparés sur gel SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été

digérées et marquées par iTRAQ afin d'en réaliser la quantification relative par spectrométrie de masse Q-TOF. Les auteurs ont quantifié 43 protéines, parmi lesquelles celles de la cascade de coagulation (p.ex. Fibrinogène bêta) et de la voie de signalisation des intégrines (Intégrine alpha-IIb, talin-1, filamin-A) étaient sous-exprimées et associées à un meilleur pronostic. En revanche, une surexpression de la protéine MBP (myelin basic protein) était associée avec un pronostic péjoratif (Datta, Chen, et Sze, 2014).

Tomlinson et coll. (2015) ont analysé les protéomes des exosomes plasmatiques provenant de patients atteints de maladie de Parkinson sporadique. Ils les ont comparés à ceux des patients présentant des mutations dans le gène GBA (glucocerebrosidase) caractéristiques de sclérose latérale amyotrophique (maladie neuro-dégénérative) et non traités, à ceux des sujets sains. L'analyse des protéines exosomales de chaque groupe de patients a été réalisée par LTQ-Orbitrap et a permis d'identifier 82 protéines permettant de différencier les patients du groupe Parkinson du groupe des contrôles, et un sous-groupe de 54 protéines a permis de différencier les patients du groupe Parkinson des patients du groupe sclérose latérale amyotrophique.

3.3.2 Analyse protéomique des exosomes urinaires pour la recherche de biomarqueurs

3.3.2.1 Protéomique descriptive

En 2004, le groupe de Knepper a publié pour la première fois une étude protéomique sur les exosomes urinaires, et a montré que 295 protéines comprenant des protéines participant à la machinerie ESCRT, des protéines membranaires et cytosoliques, étaient des protéines associées à différentes maladies rénales et provenant de tous les segments du tractus urinaire (Pisitkun, Shen, et Knepper, 2004). Le même groupe a publié en 2009, une évolution de son protocole d'isolement des exosomes urinaires et est parvenu à identifier 1132 protéines dont 927 n'avaient encore jamais été répertoriées dans les exosomes urinaires. La même année, un autre protocole d'isolement des exosomes a été publié (Hogan et al., 2009), et puis modifié dans le but d'éviter le co-isolement de la THP avec les exosomes et procédant par un gradient de sucrose. Par cette méthode, l'analyse des protéines par MS a montré d'une part, l'efficacité de la préparation

exosomale avec une réduction de l'interférence de la THP, et d'autre part, la présence de 552 protéines spécifiquement exosomales.

La préparation exosomale a encore été simplifiée par l'introduction d'une étape de séparation des peptides tryptiques selon leur point isoélectrique, Zhang et coll. (2010) ont isolé les exosomes à partir de 400 mL d'échantillons d'urine provenant de huit sujets (50 mL par sujet) sains et soumis à deux ultracentrifugations. Ils ont ainsi pu identifier 512 protéines exosomales.

En 2012, Wang et coll. (2012) ont combiné la séparation sur SDS-PAGE avec un pré-factionnement MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) selon le protocole de (Gonzales et al., 2009). Ils ont ainsi analysé les exosomes des urines de 9 sujets témoins pris isolément. Les auteurs ont identifié un total de 3280 protéines dont seules 1014 sont présentes dans chacun des échantillons. Parmi les protéines constamment identifiées, on retrouve les protéines du complexe ESCRT, des protéines impliquées dans le trafic membranaire, le transport de protéines ou encore l'amarrage membranaire des exosomes. Cette publication démontre la variabilité inter-individuelle de la composition des exosomes urinaires.

Prunotto et coll. (2013) ont proposé en 2013, une approche d'enrichissement des exosomes basée sur l'immuno-capture. Dans un premier temps, ils ont collecté 100 mL d'échantillon d'urines de quatre femmes (50 mL par sujet) et procédé à une concentration des urines par centrifugation à travers une membrane avec un seuil de filtration à 10 kDa. Puis les exosomes ont été enrichis en vésicules provenant du podocyte par immuno-précipitation avec un anticorps dirigé contre la protéine CR1 (complement receptor type 1), spécifique du podocyte. Les exosomes obtenus ont été analysés par microscopie électronique. Parallèlement, les protéines exosomales ont été séparées par séparation sur SDS-PAGE puis analysées par MS LTQ-Orbitrap. Les auteurs ont ainsi détecté 1234 protéines parmi lesquelles de nombreuses sont spécifiquement exprimées dans les podocytes.

3.3.2.2 Protéomique différentielle

L'analyse protéomique des exosomes urinaires a été également utilisée pour rechercher des variations d'expression des protéines exosomales dans certaines pathologies.

Moon et coll. (2011) ont isolé en 2011, des exosomes urinaires de donneurs sains et de patients présentant une néphropathie glomérulaire de type maladie de Berger (par dépôts d'immunoglobulines) et à membrane basale fine. Les exosomes ont été isolés selon le protocole de Pisitkun et coll. (2004), les protéines séparées par SDS-PAGE et analysées par CLHP MS/MS. Les auteurs ont pu isoler un ensemble de quatre protéines (aminopeptidases N, vasorin precursor, alpha-1-antitrypsin et céruloplasmine) permettant de séparer les patients par rapport aux donneurs sains.

Une approche différente a été utilisée par Li et coll. (2011), pour comparer l'expression protéique des exosomes urinaires provenant de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules, à des témoins. Les urines de sujets témoins ont été mélangées, et les urines de patients atteints de cancer ont été traitées séparément. Les exosomes urinaires ont été préparés *via* une ultracentrifugation à 200 000 g. Les exosomes urinaires ont été caractérisés par les méthodes standards de microscopie électronique et en Western blot. Les protéines exosomales ont été séparées par SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie. Les spots d'intensité différentielle entre patients et contrôles, ont été excisés et analysés par MS. Parmi les protéines identifiées, une en particulier, la protéine LRG1, s'est révélée d'intérêt pour les auteurs car elle a été précédemment détectée dans le sérum de patients atteints de cancer du poumon. Par la suite, les auteurs ont validé, par Western blot, l'augmentation de l'expression de LRG1 dans les exosomes urinaires de patients atteints de cancer du poumon.

Raj et coll. (2012) ont comparé les protéomes des exosomes urinaires de deux groupes de témoins âgés de 25 à 50 ans et de 50 à 70 ans. Les exosomes ont été préparés par une double ultracentrifugation à 200 000 g puis purifiés par une ultracentrifugation sur double coussin de sucrose. Après préparations des protéines exosomales par séparation sur SDS-PAGE, digestion *in-gel*, marquage iTRAQ, l'analyse protéomique a été réalisée sur un Q-TOF. Grâce à la quantification relative par iTRAQ, les auteurs ont pu comparer les protéines exosomales urinaires des deux

groupes d'âge. Ils ont noté une expression différentielle de six protéines dont cinq étaient déjà connues pour leur implication dans le processus cancéreux (Tetraspanin-1, podocalyxine, Isocitrate dehydrogenase, PPAP, et annexine A5).

Le groupe de Knepper a publié en 2012 (Pisitkun et al., 2012) une étude concernant des patients portant un greffon rénal et qui ont eu un rejet de greffe. Trois groupes ont été identifiés selon le mode de rejet. Les exosomes urinaires ont été préparés selon leur protocole publié précédemment (Gonzales et al., 2009). Pour chaque groupe de patients, les exosomes ont été mixés. Les protéines exosomales ont été séparées par SDS-PAGE, digérées, puis analysées sur un LTQ-Orbitrap. Un total de 1989 protéines a été identifié. Des approches bio-informatiques de biologie des systèmes ont été utilisées pour identifier les processus dérégulés dans ces réactions de rejet de greffe, telles que la réponse immunitaire ou la réaction inflammatoire aigüe.

Chen et coll. (2012) ont réalisé l'analyse protéomique dite « shotgun » et ciblée sur les nanoparticules urinaires provenant de patients atteints de cancer de la vessie et de patients présentant une hernie. Les urines de chaque groupe de patients ont été mélangées. Les nanoparticules ont été isolées par une ultracentrifugation à 100 000 g. Les protéines exosomales ont été digérées puis analysées par chromatographie bidimensionnelle échangeuse d'ion puis phase inverse, couplée à un MS LTQ-Orbitrap. Parmi les 3760 protéines exosomales identifiées, l'analyse bio-informatique a révélé un groupe de 107 protéines différentiellement exprimées entre les groupes de patients. Parmi ces 107 protéines, 29 ont été quantifiées par SRM/MRM pour la première étape de validation. Ces 29 protéines ont permis de classer les patients selon le stade de leur maladie.

En 2013, Zubiri et coll. se sont intéressés aux expressions différentielles de protéines des exosomes urinaires provenant de patients atteints de néphropathie diabétique par rapport aux donneurs sains. Les protéines exosomales ont été séparées par SDS-PAGE et les spots d'intensité différentielle ont été excisés. Les protéines ainsi obtenues ont été digérées puis analysées par LTQ-Orbitrap. La quantification label free par « spectral counting » a révélé l'expression différentielle de 25 protéines, dont 18 sont diminuées chez les patients par rapport aux contrôles et sept augmentées. Enfin, trois protéines ont été sélectionnées car l'implication dans le diabète

était préalablement connue. La validation de ces trois protéines comme biomarqueur dans cette pathologie, a été réalisée par SRM/MRM avec un TQ. L'augmentation de leur expression a été observée chez trois nouveaux patients.

Raimondo et coll. (2013) ont comparé les urines de patients RCC et de sujets sains. Les exosomes ont été isolés *via* une ultracentrifugation, mixés pour chaque groupe, et séparés sur un gel SDS-PAGE. L'analyse par spectrométrie de masse Q-TOF a révélé 261 protéines chez les sujets sains et 186 chez les patients atteints de cancer. Les auteurs ont sélectionné un ensemble de 10 protéines, et validé ces protéines comme biomarqueur par immuno-blot. En particulier, la céruloplasmine et la podocalyxine se sont révélées les plus discriminantes pour séparer les patients des sujets témoins.

Maladie	Type de comparaison	Résultat	Etude
Maladie de Berger et néphropathie à membrane basale fine	Patients contre sujets sains	aminopeptidases N, vasorin precursor, alpha-1-antitrypsin, et la céruloplasmine permettant de stratifier les patients	(Moon et al., 2011)
Cancers du poumon non à petites cellules	Patients contre sujets sains	La protéine LRG1 est surecprimées dans les exosomes urinaires de patients	(Li et al., 2011)
Vieillissement	Sujets dont l'âge est entre 25 et 50 ans contre ceux dont l'âge est situé entre 50 et 70 ans	Expression différentielle des protéines translin-1, podocalyxine, isocitrate dehydrogenase, PPAP, carboxypeptidase N catalytic chain, et annexine A5	(Raj et al., 2012)
Rejet du greffon rénal	Comparaison des patients selon le type de rejet	Mise en évidence de protéines appartenant à des processus dérégulés selon le type de rejet	(Pisitkun et al., 2012)
Cancer de la vessie	Patients contre des sujets présentant une hernie	107 protéines différentiellement exprimées, dont 29 ont été validées par SRM/MRM et permettent de stratifier les patients	(Chen et al., 2012)
Néphropathie diabétique	Comparaison des patients avec des sujets sains	25 protéines différentiellement exprimées, dont 3 ont été validées par SRM/MRM	(Zubiri et al., 2013)
Cancer du rein	Comparaison des patients avec des sujets sains	10 protéines ont été validées par immunoblot, dont la ceruloplasmine et la podocalyxine sont les plus efficaces	(Raimondo et al., 2013)

Tableau 6 : Résumé des études de protéomique différentielle des exosomes urinaires dans des cas pathologiques Adapté de (Dear, Street, et Bailey, 2012).

4 Maladies étudiées

4.1 Maladies rénales

4.1.1 Cystinurie

4.1.1.1 Description

La cystinurie est une maladie génétique à transmission autosomale récessive qui représente 1 à 10% des causes de calculs rénaux pédiatriques (Knoll et al., 2005 ; Rogers et al., 2007). La prévalence de cette maladie est de 1 :7000 au niveau mondial avec des variations selon les ethnies. Les patients déclarent un calcul rénal entre 2 et 40 ans, avec un âge médian de première crise à 12 chez les femmes et 15 ans chez les hommes. Les patients atteints de cystinurie ont plus de 50% de chance de former des calculs pendant leur vie avec des épisodes de calculs très répétés, et un risque de récurrence de 60%. Les hommes tendent à avoir une maladie plus agressive, avec une moyenne de 3 ans entre deux épisodes, contre 5 ans pour les femmes.

La cystine est un acide aminé formé de deux molécules de cystéine liées par un pont disulfure. La cystine et les acides aminés dibasiques sont absorbés de la lumière urinaire dans les cellules du tubule proximal *via* un transporteur formé par les deux sous-unités rBAT et B(0,+)AT, qui se localise du coté luminal du tubule rénal proximal ainsi que du tube digestif. La protéines B(0,+)AT est le transporteur et rBAT régule son activité. Une fois absorbée, la cystine est hydrolysée en deux molécules de cystéine, avant d'être transportées à travers la membrane baso-latérale pour rejoindre le flux sanguin. La cystinurie est due à un défaut du transporteur trans-épithélial des acides aminés dibasiques (cystine, ornithine, lysine et arginine) dans le tubule rénal proximal. Il n'existe pas d'association pathologique avec le défaut de réabsorption de l'ornithine, la lysine et l'arginine. En revanche, l'accumulation de cystine, à cause de sa faible solubilité à pH urinaire, va former des cristaux et finalement amener à la formation de calculs de cystine.

Les études génétiques menées chez les patients atteints de cystinurie ont montré que la maladie est associée avec les mutations dans les gènes SLC3A1 et SLC7A9 qui codent respectivement pour les protéines rBAT et B(0,+)AT (Figure 15). Plus de 130 mutations ont été découvertes dans le gène SLC3A1 et plus de 90 dans SLC7A9. Sur cette base, une classification des

patients a été développée. Les patients ayant deux mutations dans le gène SLC3A1 sont définis de type A, dans SLC7A9, type B et si ils ont une mutation dans chacun des deux gènes, type AB. Les hétérozygotes ayant une mutation dans SLC3A1 ne présentent pas de taux de cystine urinaire élevé tandis que 86% des hétérozygotes ayant une mutation dans SLC7A9 ont une cystinurie élevée. Malgré les différences génétiques entre les types A et les types B, il n'existe pas d'expression clinique différente de la maladie et il n'a pas été possible de déterminer une corrélation génotype-phénotype chez les patients cystinuriques, afin de prédire l'âge de la première crise par exemple (Botzenhart et al., 2002 ; Eggermann, Venghaus, et Zerres, 2012 ; Wong et al., 2015).

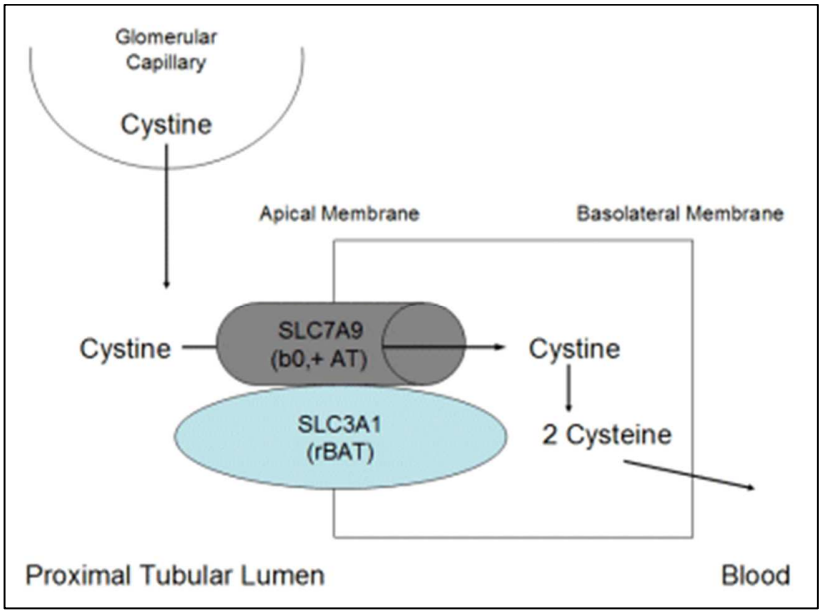


Figure 15 : Schéma du transporteur de la cystine localisé dans le tubule proximal rénal.
La cystine est réabsorbée via le transporteur formé des sous-unités rBAT et B(0,+)AT. Elle est ensuite réduite en deux cystéines afin d'être relâchée dans la circulation sanguine (issu de www.cystinuria.com).

Le diagnostic de base de la cystinurie s'effectue par une analyse des urines au microscope. Entre 17 et 25% des urines de patients cystinuriques présentent des cristaux hexagonaux, translucides et blancs, typiques de la pathologie. Lorsqu'un patient se présente avec un épisode de calcul rénal, les praticiens demandent la mesure de multiples composés urinaires associés avec la formation de calcul, dont la cystine. L'excrétion normale de cystine par jour est de 30 mg/L, tandis que les homozygotes pourront avoir une cystinurie dépassant les 300 mg/L par jour. L'analyse de la composition du calcul peut également permettre de parfaire ce diagnostic.

Le traitement de la cystinurie repose essentiellement sur la prévention de la survenue d'épisodes de calculs rénaux, et il repose sur des règles hygiénodiététiques strictes et sur la compliance des patients pour leur mise en œuvre au quotidien (Traxer, Lechevallier, et Saussine, 2008). Tout d'abord on recommande une forte hydratation à ces patients. Au moins trois litres par jour chez les enfants et cinq litres par jour chez les adultes afin que la cystinurie passe en dessous de 250-300 mg/dL, son seuil de cristallisation à pH 7. Un régime pauvre en méthionine, précurseur de la cystine, leur est conseillé. La cystine étant plus soluble à un pH supérieur à 7, un traitement peut être donné à base de citrate de potassium ou de bicarbonate de sodium afin d'alcaliniser les urines. Si malgré ces deux étapes, la cystinurie ne diminue pas, il est possible de passer à un traitement pharmacologique, par des sulfhydryles. Ces molécules ont pour objectif de réduire le pont disulfure qui lie les deux molécules de cystéines. Ces deux molécules de cystéines, combinées au groupement thiol du médicament, sont 50 fois plus solubles dans les urines que la cystine. Cependant ces traitement ont des risques d'effets secondaires chez 50% des patients, et sont aussi variés que des allergies, nausées, hépatotoxicité, protéinurie entre autres.

Malgré ces mesures préventives, la plupart des patients vont nécessiter des interventions urologiques, dues à la récurrence des calculs rénaux. Les techniques les moins invasives sont généralement préférées, mais il peut être nécessaire d'avoir recours à des chirurgies ouvertes afin de retirer des calculs trop gros.

De nombreuses études récentes ont montré que la formation de calculs rénaux est un facteur de risque pour le développement de néphropathies chroniques, et les patients cystinuriques ainsi que d'autres maladies associées à la formation de calculs rénaux sont à plus grand risque. Deux études ont montré que les patients cystinuriques avaient un risque de 5 et 17% d'insuffisance rénale (Assimos et al., 2002 ; Rogers et al., 2007). De plus, une de ces études a montré que 14,1% patients cystinuriques nécessitent une néphrectomie contre seulement 2,9% des lithiasiques (Assimos et al., 2002).

4.1.1.2 Intérêt de l'étude

Le diagnostic précoce est impératif pour une prise en charge optimale afin de limiter le risque de récidive lithiasique et préserver la fonction rénale du patient. La détermination par protéomique d'un index pour stratifier les patients selon leur risque permettrait d'améliorer largement la prise en charge des patients. De plus, une analyse protéomique permettrait d'avoir un nouveau point de vue sur la physiopathologie, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

A part mon travail de thèse, aucune étude protéomique globale n'a été publiée sur la cystinurie (Bourderioux et al., 2014).

4.1.2 Cancer du rein

4.1.2.1 Description

Le cancer du rein est le neuvième cancer le plus commun au niveau mondial, avec plus de 330 000 nouveau cas diagnostiqués en 2012 et plus de 140 000 décès. Une tumeur du rein correspond à la formation et au développement d'un amas de cellules dans l'un des deux reins. Selon les caractéristiques des cellules, il peut s'agir d'une tumeur bénigne ou d'un cancer du rein. Moins de 10% des tumeurs du rein sont bénignes : c'est par exemple le cas des oncocytomes, des adénomes papillaires et des angiomyolipomes (tumeurs graisseuses mésenchymateuses). Le cancer du rein ou carcinome à cellules rénales (RCC, Renal Cell Carcinoma) représente une collection de différents types de tumeurs, chacun provenant de différents parties du néphron et possédant diverses caractéristiques génétiques, histologiques, et, dans une certaine mesure, phénotypes cliniques. Les trois types les plus frequents sont :

1. Le plus courant, le cancer du rein à cellules claires, représente 70% des cancers du rein. Il doit son nom à cause de la grande quantité de lipide dans les cellules, qui se dissout lors de la préparation histologique, laissant un cytoplasme clair.
2. Le deuxième type de cancer est le carcinome tubulopapillaire, qui représente 10 à 15% des RCC. Il est divisé en deux groupes : le type 1, et le type 2 qui est plus agressif.

3. Le RCC chromophobe est le troisième type, il représente 3 à 5% des cancers du rein, et présente le moins de risque de développement de métastases.

L'incidence de tous les grades de ce cancer a augmenté au cours de plusieurs années, contribuant à un taux de mortalité en constante augmentation (Chow et al., 1999 ; Hollingsworth et al., 2006). Le tabagisme actif et passif est un facteur de risque établi pour le carcinome rénal. L'obésité (spécifiquement l'indice de masse corporelle) ainsi que l'hypertension sont également des facteurs de risque connus. Le RCC semble être plus fréquent chez les patients atteints d'insuffisance rénale terminale, de maladie kystique rénale acquise, et de sclérose tubéreuse que dans la population générale. La plupart des patients n'ont pas de facteur de risque identifiable, et les mécanismes pathogènes sous-jacents aux facteurs de risque établis restent obscurs. Environ 2 à 3% des cas sont familiaux. Le plus remarquable est le syndrome de Von Hippel-Lindau (1 à 36 000 naissances), qui se caractérise par le développement de plusieurs tumeurs vasculaires, y compris des RCC. Les cancers à cellules rénales dans ce syndrome ont donc tendance à être précoces et multifocaux.

Plus de 50% des RCC sont actuellement détectés fortuitement. La proportion de petites et accidentelles tumeurs rénales a considérablement augmenté en raison de l'utilisation généralisée de l'imagerie abdominale par exemple l'échographie, la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cependant, certains patients atteints de RCC se présentent encore avec des symptômes cliniques, tels que la douleur de flanc, une hématurie et une masse abdominale palpable; des symptômes métastatiques comme la douleur osseuse ou des nodules pulmonaires. Afin de stratifier précisément les RCC, la tomodensitométrie abdominale et thoracique ou IRM est obligatoire. Une biopsie de la tumeur rénale fournit une confirmation histopathologique de malignité avec une grande sensibilité et spécificité. Une biopsie diagnostic est particulièrement nécessaire avant le traitement avec les thérapies d'ablation. Elle est également indiquée chez les patients présentant une maladie métastatique avant de commencer un traitement systémique (Escudier et al., 2014).

Le système le plus couramment utilisé pour classifier les RCC est le système TMN (Tumor Node Metastasis) de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). Ce système contient trois

composants: le T indique la taille de la tumeur primaire et l'étendue de l'invasion; le N décrit l'état de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux; et le M indique s'il y a des métastases distantes ou non. Des nombres ou lettres apparaissent après les lettres T, N et M pour catégoriser la taille de la tumeur ou l'étendue de la maladie.

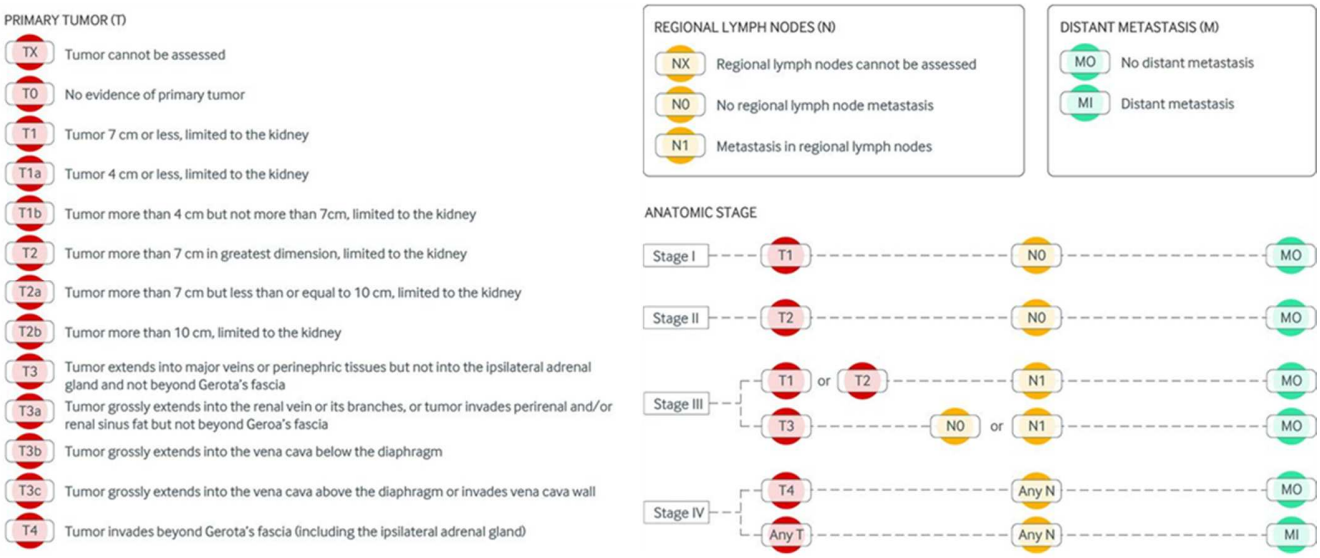


Figure 16 : Tumor Node Metastasis (TNM) classification pour le cancer du rein (Jonasch, Gao, et Rathmell, 2014)

Environ les trois quarts des personnes atteintes de RCC présentent une maladie localisée, et un traitement local définitif reste la méthode de référence pour la gestion des patients sans signes de métastase (Campbell et al., Practice Guidelines Committee of the American Urological Association, 2009). Le traitement du cancer du rein métastatique a beaucoup changé au cours des 15 dernières années. La pratique établie est de réaliser une néphrectomie de réduction tumorale avant de commencer un traitement systémique dans la plupart patients. Il est suivi par un traitement avec une combinaison approuvée d'agents choisis, qui comprennent des médicaments immunothérapeutiques, agents anti-angiogéniques et inhibiteurs de mTOR. Une étude tend à montrer une augmentation de la survie globale des patients atteints de cancer du rein métastatique qui ont été diagnostiqués après 2005. La survie médiane de patients recevant une néphrectomie de réduction tumorale a augmenté avec l'introduction de la thérapie (19 contre 13 mois), tandis que la médiane de survie chez les patients ne recevant pas une

néphrectomie n'a que légèrement augmenté (4 *vs.* 3 mois) (Conti et al., 2014). Néanmoins, même avec un traitement, chez la plupart des patients la maladie progresse et est la cause de leur décès.

4.1.2.2 Biomarqueurs connus identifiés au moyen de l'approche protéomique

Plusieurs groupes ont analysé par protéomiques les fluides biologiques de patients RCC afin d'identifier des biomarqueurs.

En 2008, Bosso et coll. (2008)ont analysé le profil protéiques des urines de 39 patients RCC contre 29 sujets sains par MALDI-TOF. Un ensemble de trois signaux a été détecté, permettant de différencier les patients des témoins avec une sensibilité de 85% et une spécificité de 90%. Les auteurs ont ensuite analysé ces signaux par LC-ESI-MS/MS, et sont parvenus à identifier l'un d'eux comme étant un fragment de THP.

En 2012, Gianazza et coll. (2012) se sont intéressés au peptidome sérique de patients RCC. Pour cela, ils ont analysé par MALDI-TOF le sérum de 92 sujets sains, 85 patients RCC et 29 patients non-RCC. Un groupe de cinq ions permettant de discriminer les RCC des non-RCC a été découvert, avec une spécificité de 90% pour une sensibilité de 94%. Les auteurs se sont ensuite intéressés à l'origine protéique de ses ions, et sont parvenus à identifier par MALDI-TOF/TOF et ESI-Q-TOF les protéines SDPR (Serum Deprivation-Response Protein) et la zyxin comme étant sous exprimées chez les patients RCC. Ils ont également identifié les protéines Serglycin et TMSL3 (hymosin β-4-Like Protein 3) comme étant surexprimées. Le même groupe a publié une étude similaire en 2014, avec un nombre plus important de patients RCC (137) et de non RCC (153) (Chinello et al., 2014). Ils ont identifié une signature de 12 ions permettant de séparer les 2 groupes. De ces 12 ions, trois ont été identifiés comme fragments de THP, de Meprin-1α et de GPR162 (Probable G-protein coupled receptor 162).

Frantzi et coll. (2013) se sont également étudié le peptidome de patients RCC, mais par CE-MS cette fois-ci. Ils ont comparé les peptides urinaires de 40 patients RCC, 26 sujets sains, 8 patients non RCC et 34 sujets avec des prédispositions au cancer du rein. Les auteurs ont détecté 86 peptides différentiellement exprimés entre les RCC et les non RCC. Ce panel a été validé chez 30 patients RCC supplémentaires et 46 non RCC, et permet la classification avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 87%. L'analyse par orbitrap a par la suite permis l'identification de

40 peptides, dont 27 se sont révélés être des fragments du collagène. D'autres peptides abondant sont des chaînes de fibrinogène ainsi que la sous-unité gamma de la Na^+-K^+ ATPase.

Raimondo et coll. (2013) ont analysé en 2013 le protéome des exosomes urinaires de patients RCC. Ils ont séparé les mélanges de protéines exosomales de neuf patients et neuf sujets sains sur gel SDS-PAGE avant d'identifier les protéines par Q-TOF. Ils ont identifié 261 protéines des contrôles et 186 chez les RCC. Pour finir, ils ont validé l'expression différentielle de 10 protéines par western blot.

4.2 La mucoviscidose

4.2.1 Description

La mucoviscidose (MV) est la maladie génétique héréditaire à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans les populations européennes. En France, un nouveau-né sur 4600 est atteint de MV. Elle touche principalement les organes respiratoires et digestifs. C'est en 1989, que des mutations dans le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmenbrane conductance Regulator) sont impliquées dans la MV. Il s'agit d'un gène codant une protéine dont la fonction principale est celle d'un canal chlorure régulé par l'AMPc (Kerem et al. , 1989; Riordan et al. , 1989; Rommens et al. , 1989).

Les manifestations pulmonaires sont la cause majeure de mortalité. Le défaut fonctionnel de CFTR est provoqué par la synthèse de protéines qui seront dégradées de façon prématurée (par exemple dans la mutation la plus fréquente F508del CFTR), soit par une fonction anormale (par exemple la mutation G551D) ou encore par l'absence de synthèse (les mutations codon stop, par exemple Y122X) à la membrane entraine la déshydratation et l'augmentation de la viscosité du mucus qui conduisent à une obstruction chronique des bronches. Les poussières et les bactéries sont difficilement évacuées et les propriétés antibactériennes du mucus sont diminuées. Ces affections favorisent l'apparition d'une infection précoce, devenant rapidement chronique associée à une réaction inflammatoire (Döring, 1996). Le cercle vicieux inflammation chronique et surinfection bactérienne aboutit à la fibrose sévère du tissu pulmonaire et à une

insuffisance respiratoire. La deuxième manifestation la plus importante est l'obstruction intestinale. Elle se manifeste dès les premiers jours de vie chez 10 à 20% des nouveaux-nés par un ileus méconial (rétention des selles primitives). Un syndrome d'occlusion intestinale distale peut également survenir chez l'enfant malade. Ces obstructions sont liées à une mauvaise hydratation des selles. D'autres manifestations de la maladie concernent une insuffisance pancréatique, un risque plus élevé de cirrhose biliaire ou encore une hypofertilité.

Le dosage des ions chlorure dans la sueur des patients représente l'examen le plus simple pour le dépistage de la MV parce que chez les malades, les glandes sudoripares ont une teneur augmentée en ions sodium, potassium et chlorure. La sueur est obtenue grâce au passage d'un faible courant à travers la peau entre deux électrodes. Lorsque la concentration d'ions chlorure dans la sueur est supérieure à 60 mmol/l, le test est positif. Une autre technique de dépistage consiste à mesurer la différence de potentiel (DDP) de l'épithélium nasal et permet l'étude in vivo des transports ioniques transépithéliaux. En effet, la valeur basale de la DDP nasale est plus électronégative chez les malades et sa variation lors de l'administration au niveau de la muqueuse nasale d'amiloride, un inhibiteur des canaux sodiques, est plus élevée. Le dépistage néonatal de la MV est systématique en France depuis novembre 2002. Il consiste à doser la trypsine immuno-réactive, une proenzyme sécrétée par le pancréas (Pitt, 2010). La détection d'un niveau de trypsine anormalement élevé (>60µg/l) conduit à réaliser un génotypage afin de rechercher les mutations les plus fréquentes du gène CFTR.

4.2.2 Etudes protéomiques de la mucoviscidose

Les études protéomiques menées sur la MV ont été focalisées principalement sur la compréhension de la physiopathologie de la maladie (Ollero, Brouillard, et Edelman, 2006). Par exemple, Davezac et coll. (2004) ont extrait les protéines de cellules HeLA exprimant une protéine CFTR sauvage et de cellules HeLA exprimant une protéine CFTR avec une délétion de la phénylalanine en position 508. L'analyse des protéines par gel bidimensionnel a permis de détecter une augmentation d'expression de quatre spots protéiques. Ces protéines ont été identifiées par MALDI-TOF, et les séquences peptidiques analysées par Q-TOF, comme étant les

cytokératines 8 et 18. Les auteurs ont ensuite validé cette surexpression de kératines par western blot, et confirmé que la diminution de leur expression par ARN interférent permet une restauration de la fonction de la protéine F508del CFTR.

Jeanson et coll. (2014) ont, quant à eux, opté pour une stratégie différente, en comparant les protéomes de cellules primaires issues de polypes nasaux de patients porteurs de mutations dans *CFTR* ou non. L'analyse par CLHP couplée à un MALDI-TOF/TOF a donné la possibilité aux auteurs de détecter une dérégulation dans 42 protéines dans les cellules primaires de patients MV. Ces protéines sont majoritairement impliquées dans le métabolisme, la voie des protéines G, l'inflammation et le stress oxydant, le repliement des protéines, la protéolyse.

Quelques études protéomiques ont également été conduites pour stratifier les patients. Le profil protéique des LBA de 39 enfants MV a été comparé à celui de 38 enfants non-MV, atteints de diverses maladies respiratoires. L'analyse par SELDI-TOF a révélé un différentiel dans l'intensité de 202 pics, permettant de classifier les patients MV des autres patients. Parmi ces protéines, 167 sont surexprimés chez les patients MV, et les auteurs sont parvenus à identifier les protéines S100A8, S100A12 et S100A9 (MacGregor et al., 2008). En 2011, une équipe s'est intéressée au protéome plasmatique de patients MV, par des approches d'électrophorèse bidimensionnelle et « shotgun ». Les plasmas de 35 patients MV, 21 porteurs sains et 31 sujets sains ont été collectés, mélangés pour chaque groupe et déplétés des protéines les plus abondantes. Les spots protéiques séparés par électrophorèse bidimensionnelle et dont l'intensité variait chez les patients MV ont été excisés et les protéines digérées et analysées par MALDI-TOF/TOF, permettant d'identifier vingt-huit protéines. D'autre part les auteurs ont analysés par LC-MS/MS de type trappe linéaire les protéines plasmatiques après digestion. Les auteurs ont identifié 327 protéines avec au moins deux peptides, dont 73 sont différentiellement exprimées chez les patients MV en comparaison avec les porteurs sains. Ces deux analyses combinées ont mis en avant des expressions différentielles de protéines impliquées dans la balance protéase/antiprotéase, les fonctions immunitaires innées, l'inflammation, ou encore la balance nutritionnelle (Charro et al., 2011).

Quon et coll. (2015) ont réalisé l'analyse du plasma de patients MV par protéomique ciblée dans le but de prédire la survenue d'exacerbations pulmonaires dans les quatre mois. Deux voies ont été suivies pour la sélection des biomarqueurs candidats. Tout d'abord la revue de la littérature a donné la possibilité aux auteurs de sélectionner cinq protéines d'intérêt. Cette analyse par SRM/MRM a permis de montrer une concentration en céruloplasmine et inteleukine-6 plasmatique plus élevé chez les patients qui ont déclaré une exacerbation pulmonaire. D'autre part, ils ont comparé l'abondance de 117 peptides (correspondant à 79 protéines) marqués isotopiquement, disponibles dans une bio banque. Ils ont pu établir un panel de six protéines ayant une sensibilité de 90% et une spécificité de 45%.

Les études protéomiques réalisées sur la MV sont décrites dans les revues (Gomes-Alves et Penque, 2010 ; Kamath et al., 2015).

Objectifs

L'objectif principal de ma thèse était de rechercher des biomarqueurs, par protéomique, dans les exosomes isolés à partir des urines. Un premier sous objectif était de développer une méthode de préparation des exosomes urinaires et d'analyse par spectrométrie de masse, puis de tester cette méthode sur les urines de patients cystinuriques. Le second sous objectif était d'appliquer cette méthode afin d'analyser les profils protéiques des exosomes issus d'urines de patients atteints de cancer du rein à cellules claires, et de le comparer à leur profil protéique après intervention chirurgicale.

Le second objectif principal était de confirmer l'existence d'exosomes dans les lavages broncho-alvéolaires de patients MV, et de comparer leurs profils protéiques à ceux de patients asthmatiques afin de démasquer une signature protéique différentielle.

Méthodes

1 Population des études et collection des échantillons

1.1 Cystinurie

Pour ce travail, nous avons fait appel à un groupe de dix volontaires sains en particulier sans antécédents rénaux, cinq hommes âgés de 25 à 63 ans et cinq femmes âgées de 24 à 85 ans. D'autre part, 14 patients cystinuriques (neuf femmes et cinq hommes, âgés de 1 à 83 ans) ont donné leur consentement pour participer à cette étude. Les échantillons d'urine de huit d'entre eux ont été utilisés pour l'analyse MS. Parmi ceux-là, six avaient des mutations dans le gène SLC3A1 et les deux autres dans SLC7A9. Les urines de six autres patients ont été collectées et utilisées uniquement pour les expériences de validation. Quatre patients avaient un débit de filtration estimé (eGFR, estimated glomerular filtration rate) selon la formule MDRD (Levey et al., 1999) inférieur à 60 mL/min/1,73m², attestant d'une fonction rénale altérée.

Nous avons collecté la première miction des urines du matin, après élimination du premier jet, soit entre 50 et 150 mL d'urines auxquels nous avons ajouté un cocktail d'antiprotéases composé d'azide de sodium à 40 mM, de fluorure de phénylméthylsulfonyle à 1,5 mg/mL et de leupeptine à 1 µg/mL (selon le protocole proposé par Knepper et coll., 2004). Les urines ont été immédiatement congelées à -80°C jusqu'au jour de la préparation des exosomes.

1.2 Cancer du rein

Les urines ont été collectées comme indiqué au paragraphe 1.1 (Méthodes). Brièvement, les urines de patients RCC ont été collectées la veille de l'intervention chirurgicale, puis après deux jours et 170 jours après l'intervention. Au moment de la collection des urines, un échantillon est immédiatement traité avec notre cocktail d'antiprotéases. Les échantillons sont conservés congelés à -80°C jusqu'à leur traitement.

1.3 Recueil des lavages broncho-alvéolaires

L'inclusion des patients a eu lieu dans le service de Pneumologie-Allergologie pédiatrique de l'hôpital Necker-Enfants Malades, à Paris. Les LBA sont réalisés habituellement dans la prise en charge des patients MV et chez des patients non-MV mais présentant des symptomatologies pulmonaires de type asthme (pathologie non inflammatoire et non infectieuse). Les LBA sont réalisés au cours d'une fibroscopie bronchique, dans le cadre du soin clinique au cours d'un examen de routine (bilan d'asthme sévère), d'un examen à visée de documentation bactériologique ou d'une intervention thérapeutique (broncho-aspiration). Les sujets participent volontairement à l'étude et signent un consentement éclairé de non-opposition. La fibroscopie est réalisée sous anesthésie générale avec un bronchoscope souple, introduit dans une bronche afin de procéder à une instillation de sérum physiologique préalablement thermostaté à 37°C, avec un volume proportionnel au poids du patient (soit 3 mL/kg). Après recueil, les LBA sont immédiatement mélangés avec un cocktail d'antiprotéases (complete Mini, Roche Applied Science, Penzbergn Germany), centrifugés à 700 g pendant 10 minutes et conservés congelés à -80°C.

2 Préparation des exosomes

2.1 Exosomes urinaires

Les exosomes urinaires ont été préparés par les étapes d'ultracentrifugation différentielle selon le protocole publié par Gonzales et coll. (2009) :

- centrifugation des urines à 17 000 g pendant 30 minutes à température ambiante, afin de séparer le surnageant des sédiments urinaires et des débris cellulaires ;
- centrifugation du surnageant à 200 000 g pendant 3h à température ambiante, afin de collecter un culot d'exosomes qui peut contenir une quantité plus ou moins importante de THP ;

- reprise des culots dans une solution de DTT à 200 mg/mL et chauffés 30 minutes à 37°C afin de réduire les ponts disulfures formés entre les monomères de THP ;
- remise en suspension des exosomes urinaires dans 8 mL de solution à 10 mM de triéthanolamine et 250 mM de sucrose, à pH 7,6 ;
- centrifugation à 200 000 g pendant 1h30 à température ambiante afin de récolter les exosomes urinaires ;
- remise en suspension du culot d'exosomes dans du PBS (Phosphate buffered saline) pour les analyse de Microscopie électronique et des expériences de réintégration cellulaire ou dans de l'urée pour les préparations soumises à la séparation SDS-PAGE et aux analyses protéomiques.
- Les concentrations protéiques des préparations exosomales sont déterminées par spectrophotométrie à l'aide d'un kit « RCDC assay » (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
- Les préparations sont conservées à -80°C jusqu'à leur analyse.

2.2 Exosomes respiratoires

Les exosomes du LBA sont isolés par des étapes de centrifugation et d'ultracentrifugation successives selon le protocole décrit par Levänen et coll. (2013), légèrement modifié. Le LBA est centrifugé à 3 000 g pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant obtenu est centrifugé à 10 000 g pendant 30 minutes avant d'être filtré à 0,2 µm puis ultracentrifugé à 200 000 g pendant 2 heures (ultracentifugeuse XL-70, Beckman, CA, USA) afin d'obtenir un culot d'exosomes. Celui-ci est remis en suspension dans du PBS, puis la concentration en protéines est déterminée par spectrophotométrie à l'aide du réactif DC du kit Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Les échantillons sont ensuite conservés congelés à -80°C jusqu'à l'analyse.

3 Analyse protéomique et analyse bio-informatique

3.1 Cystinurie

3.1.1 Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse

Les protéines exosomales sont tout d'abord séparées par isoélectrofocalisation OFF-Gel (Agilent etc). Pour cela, un volume contenant entre 60 et 120 µg de protéines, est complété avec du tampon OFF-Gel (urée 0,4 g/mL, thiourée 146 mg/mL, DTT 9,6 mg/mL, glycerol 9,6%) et des ampholytes correspondant au pH d'intérêt à 0,96%). Le programme OG12PR01 de l'analyseur OFF-Gel a été utilisé, pour lequel le voltage total accumulé est de 20000 V, l'intensité du courant fixée à 50 µA, le voltage maximum 4500 V, et la puissance maximale fixée à 200 mW. Une fois atteints les 20 kV cumulés, les fractions solubles sont récoltées et vont subir une précipitation à l'éthanol. Les culots sont remis en suspension dans une solution Rapigest SF Surfactant à 0,1% (Waters, MA, USA). Les protéines sont alors digérées par de la trypsine avec un rapport trypsine/protéines de 1:50. En parallèle, le strip de l'OFF-Gel a été coupé en 12 fractions correspondantes aux fractions solubles et digérées selon le protocole décrit par Jeanson et coll. (2012). Les peptides correspondant aux mêmes fractions ont été mélangés et dessalés à l'aide de pointes Zip Tip C18 (EMD Millipore, MA, USA) en suivant les instructions du fournisseur. Les échantillons sont alors évaporés à sec dans un SpeedVac et conservés congelés à -20°C jusqu'à l'analyse MS.

3.1.2 Analyse protéomique

Les peptides séchés sont repris dans 10 µL d'acétonitrile à 0,1% de TFA (trifluoroacetic acid) et analysés sur une nanoRSLC couplée à un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos (Dionex RSLC Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). La moitié de chaque échantillon a été concentrée sur une petite colonne d'exclusion en phase inverse de 75 µm de diamètre et séparée par CLHP en phase inverse (Pepmap C18, Dionex) en utilisant un gradient d'ACN (Acétonitrile) de 40 minutes. Le solvant A utilisé est composé à 5% d'ACN, 95% d'H2O et 0,1% d'acide formique et le solvant B composé de 80% d'ACN, 20% d'H2O et 0.085% d'acide formique.

La résolution du spectromètre de masse LTQ a été fixé à 30 000 avec 2 microscans et l'exclusion dynamique des ions fixée à 12 secondes. Les 20 ions les plus intenses ont été sélectionnés par scan MS et fragmentés par CID en utilisant 35 eV d'énergie d'activation.

3.1.3 Analyse bio-informatique

Les données brutes MS ont été traitées avec le logiciel MaxQuant (Cox et Mann, 2008) dans sa version 1.4.1.2, qui intègre le logiciel d'interrogation en base de données Andromeda, et qui a été réalisé sur la base de données humaine Uniprot (version d'avril 2013, 20 252 entrées). La recherche des masses des ions parents et fragments a été réalisée avec une déviation de masse de 4,5 ppm et 0,5 Da, respectivement. Les peptides pris en compte devaient être longs d'au moins sept acides aminés, être strictement spécifiques à la trypsine et un maximum de deux clivages manqués étaient autorisés. La carbamidométhylation des cystéines a été paramétrée comme modification fixe tandis que l'oxydation des méthionines et la N-acétylation comme modifications variables. Les FDRs aux niveaux protéiques et peptidiques ont été fixés à 1%. Les protéines ont été quantifiées grâce à l'algorithme label-free de MaxQuant, et identifiées avec un minimum de deux peptides par protéine. Toutes les analyses bio-informatiques, scatterplots et heatmaps, ont été réalisées avec le logiciel Perseus (version 1.4.1.3). Pour l'analyse statistique, nous avons utilisé les intensités LFQ (Label-Free quantification) après transformation logarithmique (base 2). L'ensemble des données a été séparé en deux groupes, huit patients contre dix témoins, et filtré pour que seules les protéines quantifiées chez au moins huit échantillons soient utilisées. Les données ont ensuite été imputées pour remplacer les données manquantes en créant une distribution gaussienne randomisée avec un écart-type de 5% relatif à celui des valeurs mesurées et une diminution égale à la moyenne de l'écart-type pour simuler un signal de faible abondance. Nous avons appliqué un test-t de Welch non paramétrique (p value < 0,01) avec un FDR fixé à 0,01. La classification hiérarchique des échantillons a été réalisée sur les protéines significatives *via* Perseus après normalisation z-score en utilisant les distances euclidiennes sur les échantillons randomisés.

3.2 Cancer du rein

3.2.1 Analyse protéomique

Les échantillons issus de patients atteints de cancer du rein ont été préparés pour la spectrométrie de masse de manière similaire à ceux des patients cystinuriques (voir paragraphe 3.1.1 des Méthodes).

Les échantillons séchés de chaque fraction ont été repris dans 10 µL ACN 10% et TFA 0,1%. Pour chaque échantillon, 5 µL ont été injectés sur une nanoCLHP couplée à un Q-Exactive PLUS (Dionex RSLC Ultimate 3000, Thermo Scientific, Waltham, MA). Les peptides ont été séparés par CLHP (Pepmap C18, Dionex). Les phases mobiles utilisées sont : (A) 0,1% d'acide formique dans de l'eau et (B) 80% d'ACN et 0,08% d'acide formique. Les peptides ont été élués de la colonne avec le gradient suivant : de 5% à 35% de B en 58 minutes, puis 40% à 80% en une minute. Après neuf minutes, le gradient est remis à 5% pour rééquilibrer la colonne pendant 20 minutes avant l'injection suivante. Deux gradients linéaires de 60 minutes ont été réalisés après les 12 échantillons OFF-gel de chaque patient pour éviter la contamination inter-échantillons. Les peptides élués de la colonne ont été analysés par DDA en utilisant une acquisition top-10. Brièvement, l'instrument a été paramétré comme suit : résolution à 70 000 pour la MS et 17 500 pour la MS/MS. La MS AGC target réglée à 3.10^6, et la MS/MS AGC target à 5.10^4. La fenêtre de masse a été réglée entre 200 et 2000 m/z. La MS et la MS/MS ont été enregistrées en mode profil, l'exclusion dynamique réglée sur 20 secondes.

3.2.2 Analyse bio-informatique

Les données brutes MS ont été traitées avec le logiciel MaxQuant (Cox et Mann, 2008) dans sa version 1.5.2.8, qui intègre le logiciel d'interrogation en base de données Andromeda, et qui a été réalisée sur la base de données humaines Uniprot (version de juillet 2014, 20 209 entrées). La recherche des masses des ions parents et fragments a été réalisée avec une déviation de masse de 4,5 ppm et 20 ppm, respectivement. Les peptides pris en compte devaient être long d'au moins sept acides aminés, être strictement spécifique à la trypsine et un maximum de deux clivages manqués étaient autorisés. La carbamidométhylation des cystéines a été paramétrée

comme modification fixe tandis que l'oxydation des méthionines et la N-acétylation comme modification variable. Les FDRs aux niveaux protéiques et peptidiques ont été fixés à 1%. Les protéines ont été quantifiées grâce à l'algorithme label-free de MaxQuant (Cox et al., 2014) et identifiées avec un minimum de deux peptides par protéine. Toutes les analyses bio-informatiques, scatterplots et heatmaps, ont été réalisées avec le logiciel Perseus (version 1.5.0.31). Pour l'analyse statistique, nous avons utilisé les intensités LFQ après transformation logarithmique (base 2). L'ensemble des données a été séparé en deux groupes, sept patients avant et sept patients après intervention chirurgicale. Les données ont ensuite été filtrées pour que seules les protéines quantifiées chez au moins cinq échantillons, dans au moins un des deux groupes, soient utilisées pour le test statistique. Les données ont ensuite été imputées pour remplacer les données manquantes en créant une distribution gaussienne randomisée avec un écart-type de 5% relatif à celui des valeurs mesurées et une diminution des valeurs de trois pour simuler un signal de faible abondance.

Nous avons ensuite, pour les données de chaque patient avant intervention, retranché les valeurs des protéines correspondantes après intervention, afin que chaque patient soit son propre témoin. Nous avons ensuite réalisé un test-t pour échantillon unique pour déterminer si la moyenne est significativement différente de zéro avec une valeur significative inférieure à 0,01. La classification hiérarchique des échantillons a été réalisée avec les protéines significatives *via* Perseus après une normalisation par z-score des données.

Pour déterminer la sensibilité et la spécificité des biomarqueurs candidats identifiés, et éventuellement identifier un sous-groupe permettant de discriminer nos patients, une analyse de courbes ROC (receiver operating characteristic) a été réalisée *via* le portail web ROCCET (www.roccet.ca) (Xia et al., 2013). Pour tester la précision de prédiction de notre ensemble de protéines, nous avons comparé les données de nos patients RCC avec les données obtenues sur les exosomes urinaires de sujets sains analysés sur un instrument LTQ-Orbitrap Velos (Bourderioux et al., 2014). Pour chaque individu, la valeur de l'expression de chaque protéine a été divisée par la valeur d'expression de la protéine Alix, une protéine exosomale, pour normalisation.

3.3 Mucoviscidose

3.3.1 Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse

Un volume correspondant à 10 µg de protéines a été prélevé pour chaque patient et complété à 20 µL avec du PBS, avant d'être soumis aux ultrasons pendant 10 minutes. Chaque échantillon a été mélangé avec 20 µL de DTT à 0,2 M et incubé pendant 45 minutes à 60°C. Les protéines ont ensuite été traitées par la technique FASP (Filter Aided Sample Preparation) selon la méthode décrite par (Wiśniewski, Zougman, et Mann, 2009). Les échantillons ont par la suite été mélangés avec 160 µL de tampon UA (urée 8 M dans 0,1 M de tris/HCl à pH 8,9) et centrifugés 15 minutes à 14 000 g dans un filtre Microcon® 30 kDa (VN0H22, Sartorius, Vivacon 500). La procédure a été renouvelée après ajout de 200 µL de tampon UA sur le filtre. Le résidu a été mélangé avec 100 µL d'iodo-acétamide à 50 mM dans du tampon UA, puis incubé pendant 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière, et enfin centrifugé 15 minutes comme précédemment. Le résidu a été dilué dans 100 µL de tampon UA et centrifugé de nouveau. Cette étape a été répétée puis le résidu remis en suspension dans du bicarbonate d'ammonium à 50 mM et centrifugé deux fois. Finalement, 40 µL de bicarbonate d'ammonium contenant de la trypsine à un rapport de 1 :50 (p/p) ont été ajoutés sur le filtre et incubés à 37°C pendant une nuit pour digestion. Les peptides tryptiques ont été collectés après centrifugation des unités de filtration pendant 20 minutes. Les échantillons ont ensuite été évaporés à sec dans un Speed-Vac et conservés congelés à -20°C jusqu'à l'analyse MS.

3.3.2 Analyse par spectrométrie de masse

Les échantillons séchés ont été repris à une concentration de 0,2 µg/µL dans ACN 10% et TFA 0,1%. Pour chaque échantillon, 5 µL (1 µg) ont été injecté (en triplicat) sur une nanoRSLC couplée à un Q-Exactive PLUS (Dionex RSLC Ultimate 3000, Thermo Scientific, Waltham, MA). Les peptides ont été séparés par CLHP en phase inverse (Pepmap C18, Dionex). Les phases mobiles utilisées, à un débit de 0,3 µL/min, sont : (A) 0,1% d'acide formique dans de l'eau, et (B) 80% d'ACN et 0,08% d'acide formique. Les peptides ont été élués de la colonne avec le gradient suivant : de 5% à 40% de B en 120 minutes, puis 40% à 80% en une minute. Après cinq minutes,

le gradient est remis à 5% pour rééquilibrer la colonne pendant 20 minutes avant l'injection suivante. Un gradient linéaire de 60 minutes a été réalisé après chaque triplicat pour éviter la contamination inter-échantillons. Les peptides élués de la colonne ont été analysés par DDA en utilisant une acquisition top-10. Brièvement, l'instrument a été paramétré comme suit : résolution à 70 000 pour la MS et 17 500 pour la MS/MS. La MS AGC target réglée à 3.10^6 comptages et la MS/MS AGC target à 5.10^4. La fenêtre de masse a été réglée entre 400 et 2000 m/z. La MS et la MS/MS ont été enregistrés en mode profil, l'exclusion dynamique réglée sur 20 secondes.

3.3.3 Analyse bio-informatique

Les données brutes MS ont été traitées avec le logiciel MaxQuant (Cox et Mann, 2008) dans sa version 1.5.2.8, qui intègre le logiciel d'interrogation en base de données Andromeda, et qui a été réalisé sur la base de données humaines Uniprot (version de juillet 2014, 20 210 entrées). Les paramètres de recherches fixés ont été les mêmes que dans notre étude sur le cancer du rein (paragraphe 3.2.2 des Méthodes). Toutes les analyses bio-informatiques, scatterplots et heatmaps, ont été réalisées avec le logiciel Perseus (version 1.5.0.31). Pour l'analyse statistique, nous avons utilisé les intensités LFQ après transformation logarithmique (base 2). L'ensemble des données a été séparé en deux groupes, trois patients MV contre sept asthmatiques, et filtrées pour que seules les protéines quantifiées dans au moins cinq échantillons soient utilisées. Les données ont ensuite été imputées pour remplacer les données manquantes en créant une distribution gaussienne randomisée avec un écart-type de 30% relatif à celui des valeurs mesurées et une diminution de 1,8 de l'écart-type pour simuler un signal de faible abondance. Nous avons appliqué un test-t non paramétrique (p value $< 0,01$). La classification hiérarchique des échantillons a été réalisée sur les protéines significatives *via* Perseus après normalisation z-score en utilisant les distances euclidiennes sur les échantillons randomisés.

4 Microscopie électronique

Pour les colorations négatives, nous avons suivi le protocole de (Pisitkun, Shen, et Knepper, 2004). Les exosomes repris dans du PBS sont mis en contact dans les proportions 1:1 (v/v) avec du formaldéhyde à 4% dans du PBS à pH 7,4. Des grilles de nickel 200 mesh ont été déposées sur une goutte de l'échantillon pendant 10 minutes, lavées sur une goutte de PBS deux fois cinq minutes, puis rincées deux fois cinq minutes avec de l'eau. Pour finir, l'échantillon a été coloré négativement en déposant la grille sur une goutte d'acétate d'uranyl à 1% pendant 1 minute. Après séchage, les grilles ont été observées avec un microscope électronique JEOL 1011 à 80 kV. Pour les marquages immunologiques, après dépôt de l'échantillon sur grille, les sites aspécifiques ont été bloqués avec de la BSA à 1%, les grilles lavées avec du PBS et incubées avec l'anticorps primaire contenant 0,02% de Triton X-100 pendant 45 minutes. Finalement, les grilles sont mises en contact avec des anticorps anti-IgG conjugués avec des billes d'or colloïdal de 6 ou 12 nm avant d'être colorées négativement et observées comme indiqué précédemment.

5 Lipides

L'analyse des lipides a été réalisée sur les exosomes urinaires après la première ultracentrifugation, la THP n'interférant pas avec cette technique. Le culot d'exosomes a été repris dans de l'eau avec un cocktail d'antiprotéases (complete Mini, Roche Applied Science, Penzbergn Germany). Les lipides ont été extraits en utilisant dix volumes d'un mélange de chloroforme et de méthanol dans un rapport 2 :1 (v/v), homogénéisé et centrifugé à 800 g pendant cinq minutes à température ambiante. La phase organique inférieure est alors transférée dans un tube en verre propre et évaporée sous un flux d'azote. Les échantillons séchés ont alors été conservés à -80°C jusqu'à leur analyse. Les lipides ont été remis en suspension dans 20 µL d'un mélange de chloroforme et de méthanol (1 :1, v/v) et analysés par chromatographie couche mince HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography). Chaque extrait organique (5 µL) a été déposé sur un gel de silice (60 HPTLC plates, Merck, Darmstadt, Germany), pré-développé dans le mélange chloroforme/méthanol (1 :1, v/v) et séparé séquentiellement par deux phases

mobiles : chloroforme/éthanol/triéthylamine/eau (30 :35 :35 :8, v/v/v/v) et hexane/éther (100 :4.5, v/v) pour séparer les principales classes de phospholipides. Pour l'analyse du cholesterol, les plaques HPTLC ont été pré-développées dans le mélange chloroforme/méthanol (1 :1, v/v) et développées dans un mélange chloroforme/acétone (95 :5, v/v). Pour détecter les composés organiques, les plaques ont été immergées dans du sulfate de cuivre à 10% (p/v) et chauffé à 185°C pendant cinq minutes. Les images à 700 et 800 nm combinées ont été acquises sur un scanner à infrarouge Odyssey (Li-Cor Biosciences, NE, USA).

6 SDS-PAGE

Les protéines exosomales (15 µg pour une coloration à l'argent et 24 à 48 µg selon la disponibilité, pour les Western blots) ont été séparées par SDS-PAGE à 10%. Pour la coloration à l'argent, nous avons suivi le protocole de (Shevchenko et al., 1996). Pour les Western blots, nous avons transféré les protéines sur une membrane de nitrocellulose, bloqué les sites aspécifiques avec du BSA 3% puis incubé la membrane avec des anticorps primaires dirigés contre nos protéines d'intérêt. Les anticorps anti-THP étaient dilués à 1/1000 (D-20; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), les anti-AQP2 à 1/100 (3487, Cell Signaling Technology, MA, USA), les anti-ALIX à 1/100 (611620, BD Transduction Laboratories, NJ, USA) et les anti-CD9 à 1/100 (C-4, Santa Cruz Biotechnology). Les membranes ont ensuite été mises en contact avec des anticorps secondaires anti-lapin (926−68071, Li-Cor Biosciences, NE, USA), anti-chèvre (926−32214, Li-Cor Biosciences) ou anti-souris (926−32210, Li-Cor Biosciences) dilués au 1/5000ème. La révélation a été réalisée avec un scanner à infrarouge Odyssey (Li-Cor Biosciences, NE, USA).

Résultats

Article 1: “New Workflow for Proteomic Analysis of Urinary Exosomes and Assessment in Cystinuria Patients”

La cystinurie est une maladie génétique rare purement rénale, causée par des mutations dans les gènes codant pour les transporteurs et de la cystine localisés dans le tube proximal. La principale expression de cette maladie est un défaut dans la réabsorption de la cystine conduisant à formation récurrente de calculs rénaux. Dans 14% des cas, les patients devront subir une néphrectomie, mais étant donné la difficulté de prévoir l'évolution de la maladie, l'identification de marqueurs d'atteinte rénale améliorerait le suivi des patients ayant un risque plus élevé. Le but de cette étude est de développer une méthode robuste, reproductible et non invasive pour l'analyse protéomique des exosomes urinaires grâce à la spectrométrie de masse à haute résolutio. Une étude pilote menée sur huit cystinurie patients contre dix contrôles a mis en évidence 165 protéines. Parmi elles, 38 sont surexprimées et permettent de distinguer les patients cystinuriques de contrôles, mais semblent également discriminer entre les formes sévères et modérées de la maladie. Ces protéines comprennent des marqueurs de lésions rénales, des protéines circulantes et une signature neutrophile. L’analyse de protéines sélectionnées par Western blot, réalisée sur les exosomes urinaires de six patients cystinuriques supplémentaire, a validé les données de spectrométrie de masse. À notre connaissance, il s’agit de la première étude protéomique sur la cystinurie, démasquant le rôle potentiel de l'inflammation dans cette maladie. Le protocole que nous avons développé est applicable à l’analyse des exosomes urinaires dans différentes maladies rénales et à la recherche de marqueurs diagnostics / pronostics.

Journal of proteome research

Article

pubs.acs.org/jpr

A New Workflow for Proteomic Analysis of Urinary Exosomes and Assessment in Cystinuria Patients

Matthieu Bourderioux,[†] Thao Nguyen-Khoa,[†,§] Cerina Chhuon,[‡] Ludovic Jeanson,[¶] Danielle Tondelier,[†] Marta Walczak,[†] Mario Ollero,[∥] Soumeya Bekri,[#] Bertrand Knebelmann,[⊥] Estelle Escudier,[¶] Bernard Escudier,[□] Aleksander Edelman,*[,†] and Ida Chiara Guerrera*[,†,‡]

[†]INSERM U1151 and [‡]Proteomics Platform Necker, PPN-3P5, SFR Necker, INSERM US24, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France

[§]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Laboratory of General Biochemistry and [⊥]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Nephrology Department, Necker Hospital, 75015 Paris, France

[¶]INSERM/UMR S933, Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

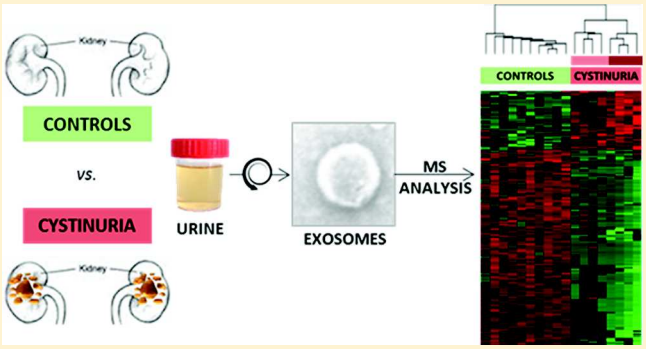
[∥]INSERM U955, Université Paris−Est Créteil Val-de-Marne, 94010 Créteil, France

[#]Department of Biochemistry, CHU Charles Nicolle, 76000 Rouen, France

[□]Department of Medical Oncology, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

Supporting Information

ABSTRACT: Cystinuria is a purely renal, rare genetic disease caused by mutations in cystine transporter genes and characterized by defective cystine reabsorption leading to kidney stones. In 14% of cases, patients undergo nephrectomy, but given the difficulty to predict the evolution of the disease, the identification of markers of kidney damage would improve the follow-up of patients with a higher risk. The aim of the present study is to develop a robust, reproducible, and noninvasive methodology for proteomic analysis of urinary exosomes using high resolution mass spectrometry. A clinical pilot study conducted on eight cystinuria patients versus 10 controls highlighted 165 proteins, of which 38 were up-regulated, that separate cystinuria patients from controls and further discriminate between severe and moderate forms of the disease. These proteins include markers of kidney injury, circulating proteins, and a neutrophil signature. Analysis of selected proteins by immunobloting, performed on six additional cystinuria patients, validated the mass spectrometry data. To our knowledge, this is the first successful proteomic study in cystinuria unmasking the potential role of inflammation in this disease. The workflow we have developed is applicable to investigate urinary exosomes in different renal diseases and to search for diagnostic/prognostic markers. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD001430.



KEYWORDS: *proteomics, cystinuria, biomarkers, exosomes, mass spectrometry, urine*

INTRODUCTION

Cystinuria is a rare genetic disease characterized by defective proximal renal tubular cystine reabsorption. Recurrent cystine stone formation remains the only clinical expression leading to nephrectomy in 14% of the patients.[1] The two genes responsible for cystinuria are SLC7A9 and SLC3A1, coding for the proteins b(0,+)-type amino acid transporter 1 (b0,+AT) and neutral and basic amino acid transport protein rBAT (rBAT), respectively. These two proteins form a dibasic amino acid transporter localized at the apical membrane of the proximal tubule epithelial cells. Several mutations on each protein lead to the same phenotype, showing no correlation with the severity of the disease (reference Orphanet: ORPHA214).[2] Simple and effective diagnosis is based on detection of cystine crystals in urine or genotyping; however, there is a need for early markers of tubular injury in order to predict the evolution of the disease and to strengthen the follow-up of patients at higher risk of chronic renal insufficiency. The only available readouts for disease severity are the recurrence of kidney stones, proteinuria, and low estimated glomerular filtration rate (eGFR).

The role of environmental factors of cystinuria is poorly investigated. Diet is the main factor that is currently taken into

Special Issue: Environmental Impact on Health

Received: September 26, 2014
Published: November 3, 2014

 © 2014 American Chemical Society

account as the therapeutic approach of this disease. Cystine crystals are associated with low urinary pH and a diet rich in meat.[3] Treatments are based on hyperdiuresis (>3 L/day), alkalinization of urine by oral intake of sodium bicarbonate (8−16 g/day), and limited meat consumption.[4] In addition, it is considered that decrease in methionine, a precursor of cysteine, is beneficial for cystinuria patients; namely, a diet rich in fish is beneficial.[5]

Global studies, in general, and proteomics, in particular, are useful approaches in the search for biomarkers, provided that the analyzed samples contain proteins related to the physiopathology. Urine, the body fluid of choice for renal diseases, presents challenges for proteomic analysis as it contains proteins secreted by the kidney, proteins filtered from plasma, a large array of proteolytic peptides, and urinary exosomes.[6] Exosomes are small (40−100 nm) membrane-bound vesicles secreted by numerous cell types through membrane invagination, endosome maturation into multivesicular bodies (MVB), and fusion of the limiting membrane of the latter with the plasma membrane.[7] They are present in all body fluids, and they carry soluble and membrane proteins, lipids, mRNAs, miRNAs, and other cytosolic molecules. Urinary exosomes therefore contain proteins expressed by the kidney or urinary bladder epithelial cells[8,9] and constitute an excellent, noninvasive source to search for biomarkers of cystinuria progression. Cystinuria was chosen for this pilot study for the following reasons: (i) it is a purely renal disease and (ii) although diagnosis of cystinuria is flawless most times, we lack prognosis markers; indeed, we recently observed that 30% of adult patients develop chronic renal failure (CRF) (eGFR < 60) over time. This proportion is unexpected and does not result only from surgical procedures and nephron reduction. Therefore, other factors, like renal inflammation, could contribute to renal damage in this stone disease. Searching for such markers in urinary exosomes seemed appealing.

The aim of the present study was to develop a workflow that allows robust and reproducible proteomic analysis of urinary exosomes and to test if this approach can contribute in the search for markers of kidney diseases and in the understanding of physiopathology.

The analysis permits the comparison of diagnostic power of protein signature with reference diagnostics tests as the panel of 165 proteins that can clearly separate cystinuria patients from control subjects. The results suggest a potential for stratifying the patients according to the severity of the disease earlier than with eGFR. Finally, the differentially expressed proteins point to the importance of inflammation in cystinuria.

■ METHODS

Urine Collection, eGFR, and Cystinuria Determination

All subjects provided written informed consent before the study. First morning void of urine (50−150 mL) was collected in a sterile container and mixed with an antiprotease cocktail (3.30 mM NaN_3, 2.5 mL of 0.2 mg/mL PMSF, and 1 μg/mL leupeptin[10]) and frozen at −80 °C within 3 h after collection. For cystinuria patients, eGFR was calculated using, for adults, the modification of diet in renal disease (MDRD) formula and, for children, the Schwartz formula, based on creatininemia.[11,12] Cystine concentration was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) using AminoTac AminoAcid Analyzer (Jeol, MA, USA). For leukocyte detection, we dipped reagent strips (Multistix 8 SG, Siemens, Erlangen, Germany) directly in urine samples.

Exosome Preparation

Six different protocols for exosome preparation were tested: three published protocols and three modified versions[9,13,14] (protocol details are schematized in Table 1 of the Supporting Information). Protocol "ModB", corresponding to a previously published protocol by Gonzales et al., was chosen for exosome isolation in all subsequent experiments.[13] Briefly, the urine sample mixed with antiproteases was centrifuged at 17 000 *g* for 30 min at 20 °C. The 17 000 *g* supernatant was ultracentrifuged at 200 000 *g* for 3 h at 20 °C on an XL-70 ultracentifuge (Beckman, CA, USA). The pellet was suspended in 300 μL of 200 mg/mL dithiothreitol (DTT) and heated at 37 °C for 30 min. The sample was complemented with 8 mL of "isolation solution" (250 mM sucrose, 10 mM triethanolamine, pH 7.6) and centrifuged at 200 000 *g* for 1.5 h at room temperature. Eventually, the pellet was resuspended in 100 μL of 2 M urea for immunoelectrofocalisation (IEF) fractionation, Western blot (WB) analysis, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver staining, or in phosphate sodium buffer (PBS) for immunoelectron microscopy. Protein concentration was determined using the reducing agent and detergent compatible (RC-DC) assay (Bio-Rad, CA, USA). Samples were then stored and frozen at −80 °C until further experiments.

1D SDS-PAGE Silver Staining and Immunoblotting

A 15 μg sample of the exosomes obtained was separated by 10% 1D SDS-PAGE. Proteins were stained using silver nitrate.[15] For Western blotting, 48 μg or 24 μg of exosomes were used depending on sample availability.[16] Exosomes protein samples were separated by 10% 1D SDS-PAGE, and they were transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) and probed with anti-THP at 1/1000 (D-20; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), anti-AQP2 at 1/100 (number 3487, Cell Signaling Technology, MA, USA), anti-ALIX at 1/100 (Purified Mouse Anti-AIP1, 611620, BD Transduction Laboratories, NJ, USA), or anti-CD9 at 1/100 (C-4, Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies. The blots were incubated with IRDye 680RD goat antirabbit (926−68071, Li-Cor Biosciences, NE, USA), IRDye 800CW donkey antigoat (926−32214, Li-Cor Biosciences), or IRDye 800CW goat antimouse (926−32210, Li-Cor Biosciences) secondary antibody at 1/5000 and were visualized using the Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences).

Electron and Immunoelectron Microscopy

Immunoelectron microscopy was performed according to Pisitkun et al.[9] Briefly, the sample was mixed with 4% paraformaldehyde (in PBS, pH 7.4) in a 1:1 ratio. Two-hundred mesh nickel grids were floated on a droplet of the sample for 10 min. After being blocked with 1% BSA and washed with PBS, the grid was incubated with primary antibody containing 0.02% Triton X-100 (to permeabilize the vesicle membranes) for 45 min at room temperature. Grids were exposed to primary antibodies recognizing AQP-2 at 1/100, ALIX at 1/100, or CD9 1/100 and then were exposed to species-specific anti-IgG antibodies conjugated to colloidal gold particles (6 or 12 nm) (British Biocell International). For electron microscopy analysis, the grid was washed on a PBS droplet for 5 min twice and subsequently on water for 5 min

Table 1. Description of Cystinuria Patients. Exosomes Prepared from Urine Samples of Patients Cy1−Cy8 Were Used for MS Analysis, whereas Those from Patients Cy4−Cy6 and Cy9−Cy14 Were Used for WBs[a]

Patients	sex	Age (years)	Analysis	Gene	Allele 1	Allele 2	3rd mutation	Cystine	Creatininemia	eGFR	Protein/ creatinuria	Leukocytes
Cy1	F	83	MS	*SLC3A1*	c.566C>T (p.Thr189Met)	c.979_980del (p.Asp327X)	c.1699_1700del (p.Arg567GlyfsX9)	613	248	16	263.8	Neg
Cy2	F	41	MS	*SLC3A1*	Duplication exon 5 to 9	Duplication exon 5 to 9	N.A	386	78	69	8.4	Neg
Cy3	M	40	MS	*SLC3A1*	c.1190A>G (p.Tyr397Cys)	c.1190A>G (p.Tyr397Cys)	N.A	199	104	68	6.5	Neg
Cy4	M	60	MS, WB	*SLC7A9*	c.91delinsTGTGAT (p.Gly31CysfsX61)	c.313G>A (p.Gly105Arg)	N.A	504	101	65	29.7	++
Cy5	F	58	MS, WB	*SLC3A1*	c.808C>T (p.Arg270X)	Deletion exon 3 to 9	N.A	319	62	86	10.2	Neg
Cy6	F	62	MS, WB	*SLC3A1*	c.1400T>A (p.Met467Lys)	Duplication exon 5 to 9	N.A	357	112	43	N.A	N.A
Cy7	F	63	MS	*SLC3A1*	c.808C>T (p.Arg270X)	Deletion exon 3 to 9	N.A	404	163	28	114.5	+
Cy8	F	39	MS	*SLC7A9*	c.313G>A (p.Gly105Arg)	c.313G>A (p.Gly105Arg)	N.A	558	95	84	N.A	N.A
Cy9	M	28	WB	N.A	N.A	N.A	N.A	221	74	113.5	4.5	Trace
Cy10	M	84	WB	N.A	N.A	N.A	N.A	259	345	15	61.5	Neg
Cy11	F	23	WB	*SLC3A1*	N.A	N.A	N.A	460	101	59	11	Neg
Cy12	F	23	WB	N.A	N.A	N.A	N.A	645	58	112	119.0	Neg
Cy13	F	15	WB	N.A	N.A	N.A	N.A	544	65	92*	14.5	Neg
Cy14	M	1.25	WB	*SLC3A1*	N.A	N.A	N.A	1924	17	N.A	89.3	Neg

[a]Abbreviations in the table: Neg, negative; N.A, not available. Cystine is expressed in μmol/mmol; creatininemia is expressed in μmol/L; protein/creatinuria ratio is expressed in mg/mmol; leukocyte is expressed by number of leukocytes per mL: Neg, no leukocytes detected. eGFR was calculated using, for adults, MDRD formula based on Levey et al.; ∗ denotes eGFR based on Schwartz et al. Patients with eGFR <60 mL/min/1.73 m^2 are highlighted in red.

twice. The sample was negatively stained by floating grids on droplets of 1% uranyl acetate for 1 min. After drying, the grids were examined with a JEOL 1011 electron microscope operated at 80 kV. One-hundred fields were captured in order to have a good overview of the disparity in diameter of the isolated structures. Images acquired were analyzed using ImageJ 1.47v (freely available at http://imagej.nih.gov/ij/).

Lipid Analysis

Lipid analysis was performed on urinary exosomes obtained by the first ultracentrifugation since Tamm−Horsfall protein (THP) does not interfere with this method. The exosomes pellet was resuspended in water with protease inhibitor cocktail (complete Mini, Roche Applied Science, Penzbergn Germany), and total lipids were extracted using six volumes of chloroform/methanol at a 2:1 ratio (v/v), vortexed, and centrifuged at 800 *g* for 5 min at room temperature. The organic (lower) phase was transferred to a clean glass tube and evaporated under nitrogen stream. Dried samples were kept at −80 °C until analysis.

Lipids were resuspended in 20 μL of chloroform−methanol (1:1, v/v) and analyzed by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). Each organic extract (5 μL) was spotted on silica gel (60 HPTLC plates, Merck, Darmstadt, Germany), predeveloped in chloroform−methanol (1:1, v/v), and separated sequentially by two mobile phases: chloroform−ethanol−triethylamine−water (30:35:35:8, v/v/v/v) and hexane−ether (100:4.5, v/v) for resolution of main phospholipid classes. For cholesterol analysis, HPTLC plates were predeveloped in chloroform−methanol (1:1, v/v) and developed in chloroform−acetone (95:5, v/v).[17] To detect organic compounds, plates were dipped in 10% CuSO4 (w/v) and heated at 185 °C for 5 min. Combined images at 700 and 900 nm were obtained using the Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences).

Isoelectric Focusing Analysis

Fifty to 120 μg of exosomal proteins obtained from urine were used for separation by isoelectric focusing (IEF) fractionation on an OFF-Gel 3100 fractionator (Agilent Technologies, CA, USA) by following manufacturer's instructions. The IEF was performed on 13 cm long immobiline strips, pH 3−10, in 12 fractions (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) by applying the standard protein separation OG12PR01 program (total final accumulated voltage is set at 20 000 V, current intensity is fixed at 50 μA, maximum voltage set to 4500 V, maximum power set at 200 mW).

Protein Digestion and NanoLC−MS/MS

After OFFgel, the 12 liquid fractions were precipitated with ethanol, centrifuged, and pellets were resuspended in Rapigest SF Surfactant 0.1% (Waters, MA, USA) and digested in-solution using a 1:50 trypsin-to-protein ratio.[18] In parallel, the gel strip was cut into 12 fractions and also digested according to Jeanson et al.[19] Peptides from the same fraction were pooled and desalted using C18 Zip tip (EMD Millipore, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were dried in a Speedvac and kept at −20 °C until MS analysis. Dried peptides were resuspended in 10 μL of 10% acetonitrile (ACN), 0.1% TFA and analyzed on a nanoRSLC-LTQ Orbitrap Velos (Dionex RSLC Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). A 5 μL sample was preconcentrated on a 75 μm of i.d. reversed-phase (RP) trapping column and separated on a RP liquid chromatographic column (Pepmap C18, Dionex) using an ACN gradient of 40 min. Solvent A was

5% ACN, 95% H_2O, and 0.1% formic acid, and solvent B was 80% ACN, 20% H_2O, and 0.085% formic acid. The LTQ-Orbitrap MS resolution was set at 30 000, 2 microscans, dynamic ion exclusion was set for 12 s. The top 20 most intense peptides were selected per MS scan and fragmented by collision-induced dissociation (CID) using 35 eV as the activation energy.

MS Data Processing and Bioinformatic Analysis

The MS files were processed with the MaxQuant software version 1.4.1.2 and searched with the Andromeda search engine against the human UniProt database[20] (release 2013.04, 20 252 entries). To search for parent mass and fragment ions, we set an initial mass deviation of 4.5 ppm and 0.5 Da (CID), respectively. The minimum peptide length was set to 7 amino acids, and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Carbamidomethylation (Cys) was set as fixed modification, whereas oxidation (Met) and N-acetylation were set as variable modifications. The false discovery rates (FDRs) at the protein and peptide level were set to 1%. The reverse and common contaminant hits were removed from MaxQuant output. Proteins were quantified according to the MaxQuant label-free algorithm using LFQ intensities; both protein quantification and identification were obtained using at least two peptides per protein.[21]

All bioinformatic analyses, including scatterplots, heatmaps, and clustering, were performed with Perseus software (version 1.4.1.3). For statistical comparison, we set two groups, eight patients versus 10 controls, and the LFQ intensities were log (base 2) transformed, then filtered to have at least eight out of 18 samples with valid values. Next, the data were imputed to fill missing data points by creating a Gaussian distribution of random numbers with a standard deviation of 5% relative to the standard deviation of the measured values and one standard deviation downshift of the mean to simulate the distribution of low signal values. We applied a nonparametric Welch *t* test ($p <$ 0,01) with a permutation-based testing correction that was controlled by using a FDR threshold of 0.01. Hierarchical clustering of proteins that survived the test was performed in Perseus after *z*-score normalization of data using Euclidean distances on randomized samples.

■ RESULTS

Description of Patients

The description of cystinuria patients is presented in Table 1. The first morning void urines were collected from 14 cystinuria patients (nine females and five males) whose ages ranged from 1−83 years. Urine samples of eight out of these 14 patients were used for MS analysis. Among these eight patients, six had mutations in *SLC3A1*, the two others in *SLC7A9*. Urine samples of six additional patients were used for validation experiments only. Four patients had eGFR values <60 mL/min/1.73 m^2, which attests abnormal renal function. Ten control subjects (five females and five males), ages ranging from 24−85 years, served as controls (Table 2) for the cystinuria group. Most of the control subjects provided urine samples several times.

Exosome Isolation and Characterization

The identification of pertinent markers relies on a robust, reproducible, and rapid preparation method to enrich the urinary exosomes, which we have developed and tested during the course of this study. Prior to examination of the patients' urinary exosomes, we evaluated different techniques to obtain reproducible exosomal protein preparations. Previously, much effort has been put into developing adequate isolation protocols based on ultracentrifugation, filtration, sucrose density gradients, and immunocapture and into removal of the largest contaminant, THP.[13,22−26] We have chosen the ultracentrifugation-based method as the best balance between purity and preparation time.[13,26] The profiles of exosomal proteins prepared according to different ultracentrifugation-based protocols (A, B, and C in Table 1, Supporting Information) were compared. A was the first protocol published;[9] B corresponded to a subsequent protocol that reduces THP contamination; and C was a recent protocol designed to increase the yield of exosome recovery.[14] Some modifications of these protocols were also tested: Mod A, Mod B, and Mod BC. Protein profiles obtained using these protocols are shown in Figure 1 of the Supporting Information. On the basis of the quality of the protein preparation with regard to the levels of THP contamination, we retained the Mod B protocol.[13]

Exosome enrichment was verified by different approaches: (i) electron microscopy, nanovesicles with the typical "cup-shape" aspect in the 20−100 nm range (Figure 1A,B) were observed;[27] (ii) lipid composition analysis that confirms a high concentration in cholesterol, sphingomyelin, and phosphatidylserine in agreement with the literature (Figure 1C);[27] and (iii) WB analysis and immunoelectron microscopy to confirm

Table 2. Description of Control Subjects.[a] Exosomes from All Control Subjects Were Used for MS Analysis (Ctrl1−Ctrl10). Exosomes from Ctrl1 (Ctrl1_a and Ctrl1_b), Ctrl2 (Ctrl2_a and Ctrl2_b), and Ctrl 6 (Ctrl6_a and Ctrl6_b) Were Used for Reproducibility Test of the Workflow over a Period of 3 Months (t1 = 0 months, t2 = 3 months), Presented in Figure 4. Exosomes from Different Collections of Ctrl1 (Ctrl1_c and Ctrl1_d), Ctrl4 (Ctrl4_b), Ctrl6 (Ctrl6_c and Ctrl6_d), Ctrl7 (Ctrl7_b), and Ctrl8 (Ctrl8_b and Ctrl8_c) Were Used for WB Analysis, Presented in Figure 6

	urine collections	sex	age (years)	analyze	leukocytes
Ctrl1	Ctrl1_a	M	25	MS *t1*	N.A
	Ctrl1_b			MS *t2*	
	Ctrl1_c			WB	
	Ctrl1_d			WB	
Ctrl2	Ctrl2_a	M	24	MS *t1*	N.A
	Ctrl2_b			MS *t2*	
Ctrl3	Ctrl3	M	26	MS	N.A
Ctrl4	Ctrl4_a	M	63	MS	Neg
	Ctrl4_b			WB	
Ctrl5	Ctrl5	M	63	MS	Neg
Ctrl6	Ctrl6_a	F	25	MS *t1*	Neg
	Ctrl6_b			MS *t2*	
	Ctrl6_c			WB	
	Ctrl6_d			WB	
Ctrl7	Ctrl7_a	F	24	MS	N.A
	Ctrl7_b			WB	
Ctrl8	Ctrl8_a	F	29	MS	N.A
	Ctrl8_b			WB	
	Ctrl8_c			WB	
Ctrl9	Ctrl9	F	60	MS	+
Ctrl10	Ctrl10	F	85	MS	Neg

[a]N.A, not available; Neg, no leukocytes detected.

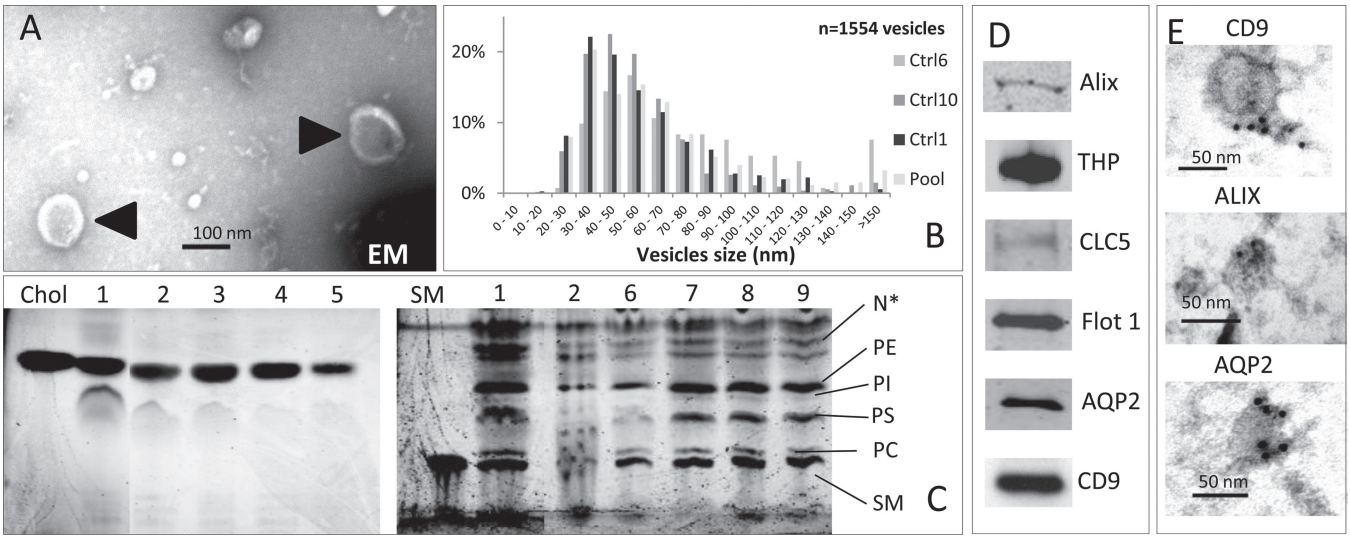


Figure 1. Characterization of exosomes. (A) Transmission electron microscopy (TEM) of isolated human urinary exosomes. The triangles point to two structures that correspond to the cup-shape specific exosomes as described elsewhere.[27] (B) Size distribution of exosomes observed by TEM of three control subjects and of a pool of eight control subjects. The graph shows that most of the vesicles range in size between 20 and 90 nm, which correspond to diameters of exosomes and exosome-like vesicles.[27] (C) TLC performed on lipid extracted from urinary exosomes isolated from nine healthy controls. Left panel, lane Chol corresponds to the marker for cholesterol; lanes 1, 2, 3, 4, and 5 correspond to samples from different controls. Right panel, phosptidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), and sphingomyelin (SM) are shown; N*, free fatty acids; lanes 1, 2, 6, 7, 8, and 9 correspond to samples from control subjects (1 and 2 are the same as the ones analyzed for cholesterol enrichment). (D) WB analysis of different exosomal or renal proteins. Exosomal markers: ALIX (Alix, 96 kDa), Flotillin (Flot 1, 47 kDa), and CD9 antigen (CD9, 25 kDa). Nephron markers: THP (70 kDa), chloride transporter ClC5 (ClC5, 83 kDa), and aquaporin 2 (AQP2, 29 kDa). (E) Immunoelectron micoscopy on exosomes probed with antibodies directed against exosomal (CD9, ALIX) or renal (AQP2) markers. Black dots represent the gold particle coupled to secondary antibody. Black bars denote 50 nm.

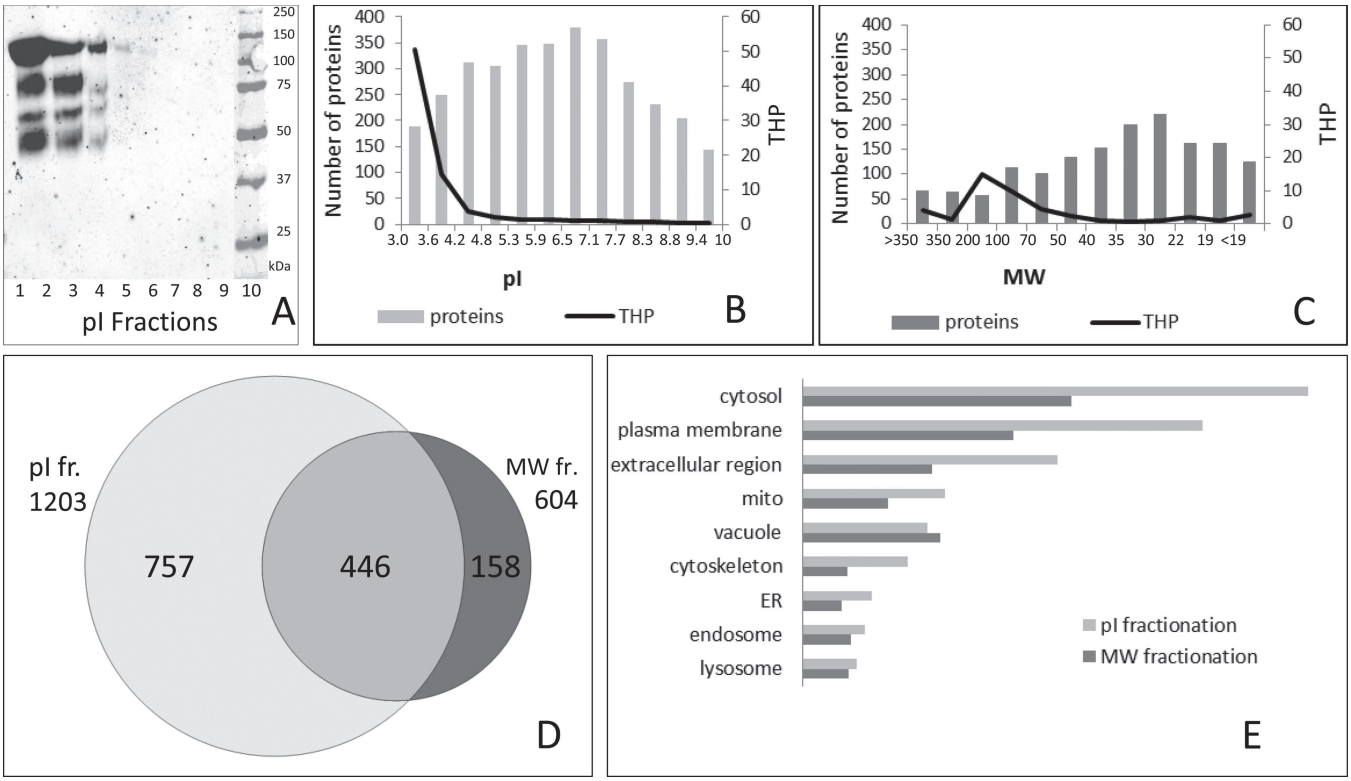


Figure 2. Comparison of MW- versus pI-based separation methods on the same urine sample. (A) WB analysis of THP protein as a function of pI fractions of exosomal proteins. (B) The histogram represents the number of proteins identified in each pI fraction, and the line represents the THP peptides identified in each fraction. (C) For the same sample, the bars represent the proteins identified in each MW fraction, and the line represents the THP peptides identified in each fraction. (D) Venn diagram of proteins identified in all pI and MW fractionations. (E) Cellular component GO annotation for identified proteins.

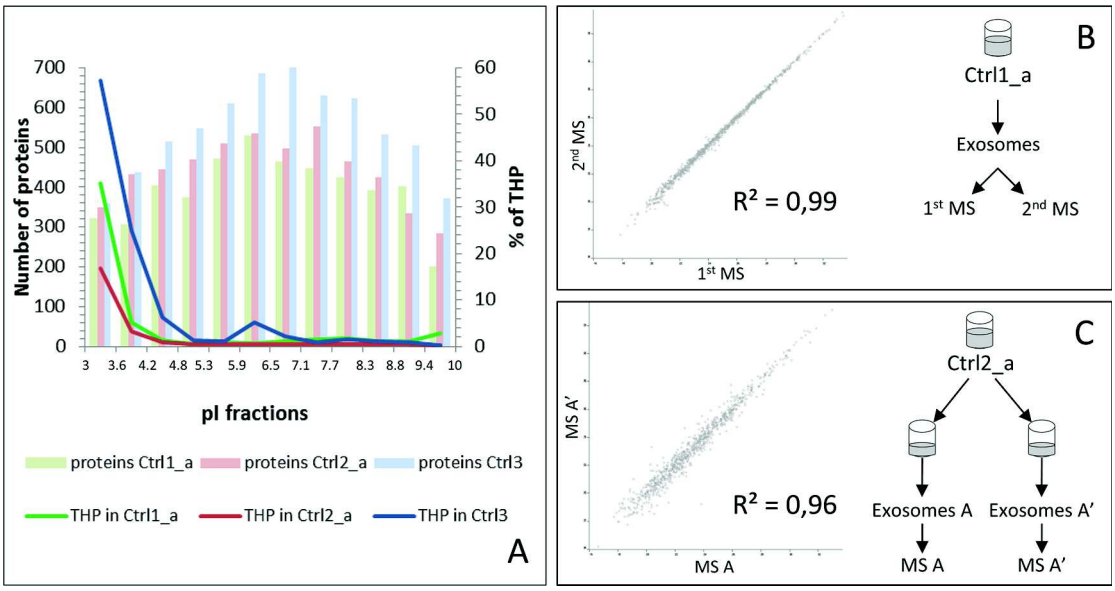


Figure 3. Robustness and reproducibility of the method. (A) Comparison of the confinement of THP (solid lines) and the number of identified proteins (bars) in three control subjects. Bars represent the exosomal proteins identified for each sample of control subjects after pI fractionation. (B) Technical reproducibility: mass spectrometry analysis of the same tryptic digest of exosomal sample. (C) Technical reproducibility of the complete workflow.

the presence of exosomal protein markers (Aquaporin 2, ALIX, CD9) (Figure 1D,E).

Protein Fractionation by Isoelectric Point and MS Analysis

Exosome analysis can lack reproducibility due to inconstant residual THP in the preparation, which leads to variability in the number of exosomal proteins identified. We addressed this issue by fractionating proteins according to their isoelectric point (pI). The predicted pI value of THP is 5.05, but the experimental pI value observed by WB analysis of urinary exosomes was lower (Figure 2A); therefore, THP migrates in the most acidic fractions, which confirms that multiple glycosylation lowers the protein pI value.[28]

MS analysis of pI fractions confirmed that most of the THP was confined in the most acidic ones, allowing consequently a rough separation of THP from most of the exosomal proteins (Figure 2B, curve). Between 150 and 400 proteins were identified in each fraction (Figure 2B, bars), although most of them were found in multiple fractions. Since separation by molecular weight (MW) using 1D-SDS-PAGE had been used in most of the previous proteomic studies on exosomes, we analyzed the same exosomes using the two fractionation methods.[9,13] THP was identified mostly in the third MW fraction, corresponding to 80−100 kDa, which probably led to a smaller number of identified exosomal proteins than in the other MW fractions (Figure 2C). In general, we observed that the number of exosomal proteins per MW fractions was smaller than that in pI fractions (Figure 2B,C). This was partially due to lower redundancy of proteins identified in multiple fractions in MW compared to pI fractionation. Both separations, by pI and by MW, have improved identification compared to the same unfractionated sample: 1203 proteins were identified after pI fractionation versus 604 by MW fractionation (using minimum two peptides per protein as a filter). Although 446 proteins were found in common, 158 were uniquely identified by MW fractionation versus 757 by pI fractionation (Figure 2D). The corresponding lists of proteins identified in each experiment are reported in Table 2 of the Supporting Information.

The identified proteins from both preparations have a similar protein class composition that is associated in the same proportions with the plasma membrane, extracellular region, and cytosol (Figure 2E).

Reproducibility and Robustness

The reproducibility of the method was evaluated at different stages of the protocol. pI fractionation led to a reproducible increase of identified proteins by a factor of at least three compared to the proteins identified prior to separation. MS analysis confirmed that most of the THP was reproducibly found mainly in the three most acidic fractions (Figure 3A). The lists of proteins identified in each experiment are reported in Table 3 of the Supporting Information.

We evaluated the robustness of the LC−MS analysis. The tryptic digest of exosomal proteins was analyzed twice on the MS at one-week intervals, and the proteins identified correlated very well (R^2 = 0.99) (Figure 3B). We evaluated the variability associated with the entire workflow by processing independently two aliquots of the same urine samples at three-month intervals (R^2 = 0.96) (Figure 3C).

Individual Exosome Protein Patterns in Time

Prior to this clinical pilot study, we also assessed the pertinence of the analysis of individuals separately versus the analysis of a pool of individuals. We compared the MS data obtained from four control individuals analyzed separately versus the MS data obtained by analyzing the pool of the four. The data suggest that exosomes obtained from pooled urine are not equally representative of the exosomes of each individual (Figure 4A; Table 5, Supporting Information).

We have also investigated the exosomal protein pattern for the same individual over a three-month interval, because urinary secretion of exosomes may vary in time for the same individual. Clustering analysis showed that samples from the same individual were more similar to each other than to other

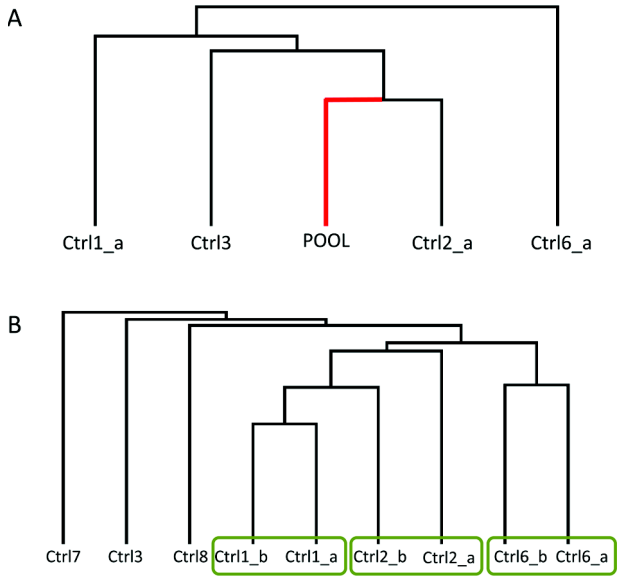


Figure 4. Clustering of exosomal protein profiles. (A) Clustering analysis for exosomal proteins (Table 5, Supporting Information) issued from four individuals and the pool of these urines. (B) Clustering obtained by comparing the proteins from different individuals (Table 4, Supporting Information) with those of different collections from the same individuals (i.e., Ctrl1_a and Ctrl1_b are issued for urines collected from the same person, Ctrl1, at a three-month interval. Exosome extraction, fractionation, and MS analysis were conducted independently at different times.

individuals (for Ctrl1 and Ctrl6), although this was not the case for Ctrl2 (Figure 4B; Table 4, Supporting Information).

Differential Protein Pattern between Cystinuria Patients and Control Subjects

Globally we could identify 1794 proteins in all samples, and we retained 1007 as eligible for statistical analysis. Comparison of exosomes of cystinuric and control subjects (described in Tables 1 and 2) highlighted 165 proteins out of 1007 that were significantly different between both groups, of which 38 were overexpressed in cystinuria patients (for all details, see Table 6, Supporting Information). This panel of proteins discriminated between control subjects and cystinuria patients (Figure 5A). The patients clustered in two subgroups, probably related to the severity of cystinuria: three patients with low eGFR values cluster together, while the four patients showing protein profiles closer to the controls had eGFR values >60 mL/min/1.73 m^2.

In addition, the protein rBAT, coded by the *SLC3A1* gene, was detected only in healthy individuals and never in cystinuria patients. We confirmed underexpression of rBAT in Cy4 and Cy6 and in three additional patients by WB (Cy9, Cy10, and Cy11) (Figure 6A).

Among the 38 proteins overexpressed in cystinuria, lipocalin-2 is related to renal injury, 18 are circulating inflammatory proteins (e.g., complement C3 and C8; fibrinogen alpha, beta, and gamma chain; and serum paraoxonase 1), and 14 are derived from neutrophils (reported in red on Figure 5B).

The expression of neutrophil elastase, matrix metalloproteinase-9 (MMP9), myeloperoxidase (MPO), and lipocalin-2 was

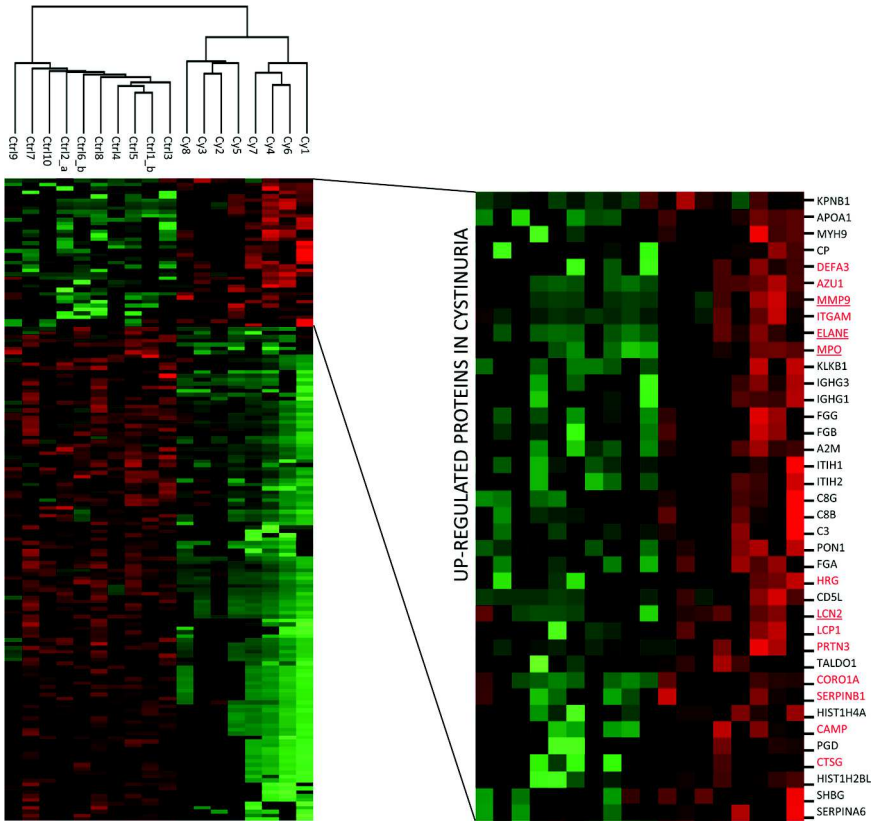


Figure 5. Clustering and heat map of exosomal proteins differentially expressed in cystinuria versus controls. Heat map obtained by comparing differentially expressed proteins. Right panel, zoom of the overexpressed proteins in cystinuria, with the corresponding gene names on the right. Proteins underlined have been tested by WB; proteins in red constitute the neutrophil signature.

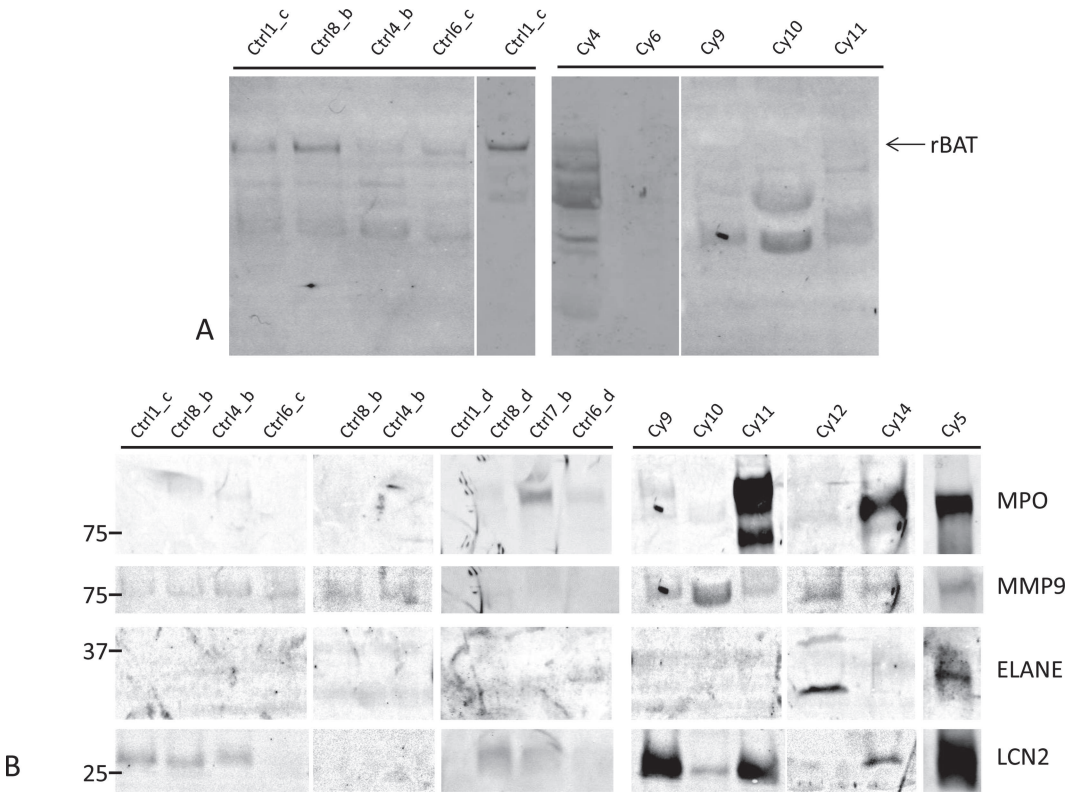


Figure 6. WB analysis of candidate biomarkers. (A) WB analysis of rBAT protein in human urinary exosomes from control subjects (Ctrl series, see Table 2) and cystinuria patients (Cy series, see Table 2). (B) WB analysis of ELANE, MPO, MMP9, and LCN2 on urinary exosomes from six cystinuria patients and 10 control subjects (see Table 2).

monitored by WB on exosomes extracted from Cy5 (previously analyzed by MS) and from Cy9−Cy14 (six additional patients, see Table 1) (Figure 6B). Controls were obtained from five healthy individuals using eight different urine collections (Table 2). Each patient had at least one protein marker highly expressed, while the four proteins were always low or nondetectable in all controls. For these four proteins, the WB results reflected very closely the proteomic data (Figure 2, Supporting Information).

The panel of potential markers could powerfully separate cystinuria patients from healthy individuals, even though not all proteins of the shortlist were overexpressed in every patient. A smaller subpanel composed of the 38 overexpressed proteins in cystinuria plus rBAT was sufficient to discriminate cystinuria patients from controls (Figure 3, Supporting Information).

■ DISCUSSION

The quality of the results relies on the robust and reproducible approach that we have developed to analyze proteins in human urinary exosomes, which combines an ultracentrifugation-based isolation protocol with pI-based fractionation. For the isolation of exosomes, we retained the protocol described by Gonzales et al. with slight modifications.[13] The novelty of the protocol described here lies in alternative protein separation: proteins were fractionated according to their pI, rather than MW, which is classically used. The pI fractionation permits the confinement of THP to the most acidic fractions, allowing the identification of twice as many proteins as the MW fractionation with high technical reproducibility. Of note, the number of proteins reported in this study may appear low compared to published data and public databases; however, the protein lists reported were obtained with different mass spectrometers, software for data analysis, and stringency parameters. For instance, Urinary Exosome Protein Database contains 1160 unique proteins, but it would reduce to 531 proteins if our stringency parameters were applied (two peptides per protein). Even the largest list published so far (3280 proteins) was obtained by combined bioinformatic analysis of urinary exosome samples from nine healthy controls.[29] However, in view of the obtained results, we decided to analyze patients individually.

Regarding the clinical design, the search for markers for rare genetic disease has some constraints in general and for cystinuria in particular. Even if Necker Hospital is a reference center for cystinuria in France, the restricted number of well-characterized patients was the main limitation.

The protein pattern determined on control subjects suggests, on one hand, an important interindividual difference in terms of protein number and abundance in urinary exosomes from control subjects and, on the other hand, that each individual may have a reliable protein signature that remains similar over three months, contrary to what has been observed in total urine proteome.[30] This information is crucial when longitudinal clinical studies are planned as it suggests that more pertinent results could be obtained if each patient is used as his own control to follow the efficacy of a treatment. Perhaps limitations in comparing data issued from inter- or longitudinal-studies using different MS and methods will be minimized in the future with widespread absolute quantification. We also show that pooling urine (by volume) from different individuals introduces a serious bias in the proteomic analysis. This information may encourage the analysis of single patients over time, for example, before and after surgery. For cystinuria, the longitudinal studies

that aim to identify prognostic biomarkers were impossible to perform in a four-year study since the evolution of the disease is very slow and develops often during life span. Furthermore, a much larger number of patients would have to be included, which was not the aim of this pilot study.

The MS analysis obtained during the course of this clinical pilot study on cystinuria patients unmasked a panel of 165 differentially expressed proteins, of which 38 proteins were up-regulated (Figure 5 and Table 6, Supporting Information, gene names highlighted in red). Three conclusions can be drawn. First, it underlines the robustness of the experimental protocol as low technical variability allows detection of biological differences. Second, protein panel has a diagnostic power as strong as classical diagnostic tests. In addition, this protein panel can discriminate severe cystinuria patients with low eGFR values from patients with normal eGFR values, raising hope that it could be used as a marker of evolution of this disease. Third, as a first global proteomic analysis in the context of cystinuria, we present 165 proteins of differentially expressed proteins that might be important in the pathophysiology of this disease. Among the proteins underexpressed in cystinuric versus controls, rBAT, the protein encoded by one of the mutated genes in cystinuria, cannot be considered as a marker of progression since it was identified in control individuals but never in patients (while $b^{0,+}$AT was never identified in our study) independently of the genotype. Of note, the 38 up-regulated proteins plus rBAT constitute the minimal protein signature for efficient diagnosis (Figure 3, Supporting Information).

Within the panel of 38 up-regulated proteins, lipocalin-2, initially identified from human neutrophils, is now known to be expressed at low levels in several human tissues including the kidney and has been reported to be a marker of proximal tubule damage and acute kidney injury (AKI).[31,32] Lipocalin-2 can form a heterodimer with MMP9, which is also found overexpressed in patients in our study. Lipocalin-2-MMP9 binding is induced by overexpression of lipocalin-2 in order to prevent MMP9 degradation and increases MMP9 enzymatic activity. In turn, MMP9 activity promotes damage progression by degrading basement membranes and extracellular matrix, liberating VEGF, and thus enabling angiogenesis. Lipocalin-2–MMP9 heterodimer is specifically formed in renal tubular epithelial cells and not in neutrophils, but it was not possible to define whether the lipocalin-2 identified in this study indeed originated from epithelial cells or from neutrophils.[33]

The presence of circulating proteins in urinary exosomal fractions could reflect a contamination by a possible proteinuria in patients. In our study, most of the patients did not present microalbuminuria, which suggests that circulating proteins may reflect early glomerular damage (Table 1). However, albumin is not significantly higher in urinary exosomal fractions from patients as compared to controls, which suggests that these proteins could be associated with a pathological status in cystinuria patients through wound healing (fibrinogen and complement C3) and antioxidant activity (PON1, which breaks down endogenous ROS by hydrolyzing oxidized phospholipids and by inactivating lipid peroxides and hydrogen peroxide).

One-third of the proteins overexpressed in cystinuria patients are neutrophil-derived. In particular, they are proteins contained either in the azurophilic granules (neutrophil elastase, cathepsin G, myeloblastin, azurocidin, MPO) or in tertiary granules (possibly lipocalin-2 and MMP9). The presence of leukocytes in urine can be due to inflammation or urinary infection. We observed a surprisingly high rate of chronic renal failure in the French cohort of cystinuria patients (close to 30%, our unpublished observations). This high rate is only partially explained by nephronic reduction (after surgery or parenchymal damage due to stones and infections). Therefore, other factors, like subclinical intrarenal inflammatory reaction to microscopic crystals, could be at play. Our findings of higher increased urinary exosomes inflammatory markers in cystinuria patients with decreased eGFR are highly suggestive of such a relationship. Of course, this small proof-of-concept pilot study is not compelling enough to claim formal cause-to-effect relationship. A larger study including more cystinuria patients and other controls with decreased eGFR values from nonstone disease will be necessary.[34,35]

Neutrophils can circulate in urine, but they may also be infiltrated in the interstitial tissue and mediate an inflammatory response through cytokine secretion. Markers of oxidative stress, such as MPO and PON1, reflect neutrophil cell activity in the kidney. The presence of neutrophil granule proteins in the exosomal fraction suggests that they may come from neutrophil exosomes, secretory vesicles, or neutrophil extracellular traps (NETs).[3636−39] Further studies are necessary to investigate if NETs are formed in cystinuria patients.

■ CONCLUSION

Very promising results were obtained by applying a new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes on 14 patients affected by cystinuria. We have identified a panel of proteins for early detection of kidney damage, which may be more precocious than classical biochemical approaches routinely used in the clinic. Studies on different renal diseases are now necessary to verify if the protein panel proposed here is specific to cystinuria or reflects early kidney damage in other renal diseases.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Protocols for exosome preparation used in our study; proteins identified by MS after pI and MW fractionation in a pool of eight control subjects; proteins identified by MS prior and after pI fractionation in three control subjects; proteins identified by MS of control subjects at three-month intervals; proteins identified by MS of control subjects analyzed individually versus pooled; and proteins identified by MS of control subjects and cystinuria patients. Protein profile of exosomes prepared according to different protocols; label-free quantification of proteins used for WB analysis; and heat map obtained by comparing a subset of differentially expressed proteins in cystinuria, all upregulated proteins and rBAT (SLC3A1). This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: aleksander.edelman@inserm.fr. Phone: +33 1 72 60 64 10.

* E-mail: Chiara.guerrera@inserm.fr. Phone: +33 1 72 60 63 31.

Author Contributions

A.E. and I.C.G. contributed equally. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Société de nephrology and Vaincre la Mucoviscidose for funding assistance. The authors thank Alain Schmitt (electron microscopy facility of the Cochin Institute, Paris, France) for help in TEM analysis of exosomes; the proteomic core facilty of the Université Paris-Descartes, 3P5; Bernadette Chadefaux-Vekemans (Laboratory of Biochemistry A, Necker Hospital) for sample collection of cystinuria patients; and Dr Jean-Philippe Jais and Nicolas Cagnard (bioinformatic core facility, Université Paris-Descartes) for advice. The authors thank Dr. Charlotte Sumida for the English editing. The authors thank PNNL and the OMICS.PNL.GOV website for providing the Venn diagram plotter tools for their analysis. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (http://proteomecentral.proteomexchange.org) via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD001430.[40]

■ REFERENCES

(1) Assimos, D. G.; Leslie, S. W.; Ng, C.; Streem, S. B.; Hart, L. J. The impact of cystinuria on renal function. *J. Urol.* **2002**, *168*, 27−30.

(2) Eggermann, T.; Venghaus, A.; Zerres, K. Cystinuria: An inborn cause of urolithiasis. *Orphanet J. Rare Dis.* **2012**, *7*, 19.

(3) Francés, F.; Corella, D.; Carrasco, P.; Sáiz, C.; Guillén, M. Modulation of the phenotypic expression in the patient with cystinuria: Influence of therapeutic intervention and diet. *Arch. Esp. Urol.* **2007**, *60*, 109−118.

(4) Barbey, F.; Joly, D.; Rieu, P.; Méjean, A.; Daudon, M.; Jungers, P. Medical treatment of cystinuria: Critical reappraisal of long-term results. *J. Urol.* **2000**, *163*, 1419−1423.

(5) Daudon, M.; Cohen-Solal, F.; Barbey, F.; Gagnadoux, M.-F.; Knebelmann, B.; Jungers, P. Cystine crystal volume determination: A useful tool in the management of cystinuric patients. *Urol. Res.* **2003**, *31*, 207−211.

(6) Good, D. M.; Zürbig, P.; Argilés, A.; Bauer, H. W.; Behrens, G.; Coon, J. J.; Dakna, M.; Decramer, S.; Delles, C.; Dominiczak, A. F.; et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 2424−2437.

(7) Stoorvogel, W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood* **2012**, *119*, 646−648.

(8) Moon, P.-G.; You, S.; Lee, J.-E.; Hwang, D.; Baek, M.-C. Urinary exosomes and proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 1185−1202.

(9) Pisitkun, T.; Shen, R.-F.; Knepper, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 13368−13373.

(10) Zhou, H.; Yuen, P. S. T.; Pisitkun, T.; Gonzales, P. A.; Yasuda, H.; Dear, J. W.; Gross, P.; Knepper, M. A.; Star, R. A. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 1471−1476.

(11) Levey, A. S.; Bosch, J. P.; Lewis, J. B.; Greene, T.; Rogers, N.; Roth, D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of diet in renal disease study group. *Ann. Intern. Med.* **1999**, *130*, 461−470.

(12) Schwartz, G. J.; Muñoz, A.; Schneider, M. F.; Mak, R. H.; Kaskel, F.; Warady, B. A.; Furth, S. L. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 629−637.

(13) Gonzales, P. A.; Pisitkun, T.; Hoffert, J. D.; Tchapyjnikov, D.; Star, R. A.; Kleta, R.; Wang, N. S.; Knepper, M. A. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 363−379.

(14) Fernández-Llama, P.; Khositseth, S.; Gonzales, P. A.; Star, R. A.; Pisitkun, T.; Knepper, M. A. Tamm−Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int.* **2010**, *77*, 736−742.

(15) Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850−858.

(16) Bensalem, N.; Ventura, A. P.; Vallée, B.; Lipecka, J.; Tondelier, D.; Davezac, N.; Dos Santos, A.; Perretti, M.; Fajac, A.; Sermet-Gaudelus, I.; et al. Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1591−1601.

(17) Guerrera, I. C.; Astarita, G.; Jais, J.-P.; Sands, D.; Nowakowska, A.; Colas, J.; Sermet-Gaudelus, I.; Schuerenberg, M.; Piomelli, D.; Edelman, A.; et al. A novel lipidomic strategy reveals plasma phospholipid signatures associated with respiratory disease severity in cystic fibrosis patients. *PLoS One* **2009**, *4*, e7735.

(18) Guerrera, I. C.; Ollero, M.; Vieu, D.-L.; Edelman, A. Quantitative differential proteomics of cystic fibrosis cell models by SILAC (stable isotope labelling in cell culture). *Methods Mol. Biol.* **2011**, *742*, 213−225.

(19) Jeanson, L.; Kelly, M.; Coste, A.; Guerrera, I. C.; Fritsch, J.; Nguyen-Khoa, T.; Baudouin-Legros, M.; Papon, J.-F.; Zadigue, P.; Prulière-Escabasse, V.; et al. Oxidative stress induces unfolding protein response and inflammation in nasal polyposis. *Allergy* **2012**, *67*, 403−412.

(20) Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies, and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367−1372.

(21) Luber, C. A.; Cox, J.; Lauterbach, H.; Fancke, B.; Selbach, M.; Tschopp, J.; Akira, S.; Wiegand, M.; Hochrein, H.; O'Keeffe, M.; et al. Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* **2010**, *32*, 279−289.

(22) Clayton, A.; Court, J.; Navabi, H.; Adams, M.; Mason, M. D.; Hobot, J. A.; Newman, G. R.; Jasani, B. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **2001**, *247*, 163−174.

(23) Prunotto, M.; Farina, A.; Lane, L.; Pernin, A.; Schifferli, J.; Hochstrasser, D. F.; Lescuyer, P.; Moll, S. Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine. *J. Proteomics* **2013**, *82*, 193−229.

(24) Raj, D. A. A.; Fiume, I.; Capasso, G.; Pocsfalvi, G. A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney Int.* **2012**, *81*, 1263−1272.

(25) Théry, C.; Boussac, M.; Véron, P.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Raposo, G.; Garin, J.; Amigorena, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 7309−7318.

(26) Alvarez, M. L.; Khosroheidari, M.; Kanchi Ravi, R.; DiStefano, J. K. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int.* **2012**, *82*, 1024−1032.

(27) Théry, C.; Ostrowski, M.; Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 581−593.

(28) Trewick, A. L.; Rumsby, G. Isoelectric focusing of native urinary uromodulin (Tamm−Horsfall protein) shows no physicochemical differences between stone formers and non-stone formers. *Urol. Res.* **1999**, *27*, 250−254.

(29) Wang, Z.; Hill, S.; Luther, J. M.; Hachey, D. L.; Schey, K. L. Proteomic analysis of urine exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *Proteomics* **2012**, *12*, 329−338.

(30) Nagaraj, N.; Mann, M. Quantitative analysis of the intra- and inter-individual variability of the normal urinary proteome. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 637−645.

(31) Mishra, J.; Ma, Q.; Prada, A.; Mitsnefes, M.; Zahedi, K.; Yang, J.; Barasch, J.; Devarajan, P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**, *14*, 2534−2543.
(32) Viau, A.; El Karoui, K.; Laouari, D.; Burtin, M.; Nguyen, C.; Mori, K.; Pillebout, E.; Berger, T.; Mak, T. W.; Knebelmann, B.; et al. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 4065−4076.
(33) Nickolas, T. L.; Forster, C. S.; Sise, M. E.; Barasch, N.; Valle, D. S.-D.; Viltard, M.; Buchen, C.; Kupferman, S.; Carnevali, M. L.; Bennett, M.; et al. NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2012**, *82*, 718−722.
(34) Mulay, S. R.; Kulkarni, O. P.; Rupanagudi, K. V.; Migliorini, A.; Darisipudi, M. N.; Vilaysane, A.; Muruve, D.; Shi, Y.; Munro, F.; Liapis, H.; et al. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1β secretion. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 236−246.
(35) Di Giacopo, A.; Rubio-Aliaga, I.; Cantone, A.; Artunc, F.; Rexhepaj, R.; Frey-Wagner, I.; Font-Llitjós, M.; Gehring, N.; Stange, G.; Jaenecke, I.; et al. Differential cystine and dibasic amino acid handling after loss of function of the amino acid transporter b0,+AT (Slc7a9) in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2013**, *305*, F1645−F1655.
(36) Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D. S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532−1535.
(37) Gupta, A. K.; Hasler, P.; Holzgreve, W.; Hahn, S. Neutrophil NETs: A novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? *Semin. Immunopathol.* **2007**, *29*, 163−167.
(38) Fuchs, T. A.; Brill, A.; Duerschmied, D.; Schatzberg, D.; Monestier, M.; Myers, D. D.; Wrobleski, S. K.; Wakefield, T. W.; Hartwig, J. H.; Wagner, D. D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 15880−15885.
(39) Borissoff, J. I.; ten Cate, H. From neutrophil extracellular traps release to thrombosis: An overshooting host−defense mechanism? *J. Thromb. Haemostasis* **2011**, *9*, 1791−1794.
(40) Vizcaíno, J. A.; Deutsch, E. W.; Wang, R.; Csordas, A.; Reisinger, F.; Ríos, D.; Dianes, J. A.; Sun, Z.; Farrah, T.; Bandeira, N.; et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 223−226.

Article 2: “Potential renal cancer diagnostic biomarkers by proteomics approach”

La recherche sur le cancer du rein est devenue récemment un problème de santé publique. En effet en 25 ans, l’incidence de ce cancer a augmenté de 40% (sensibilité au tabac, à l’obésité) devenant le troisième cancer urologique en fréquence, après les cancers de la prostate et de la vessie, et représentant désormais 2 à 3% des cancers. Ainsi, il y a aujourd’hui environ 10 000 nouveaux cas de cancers du rein diagnostiqués par an et le cancer du rein est responsable de 3 à 4 000 décès chaque année. La moyenne d’âge des patients au moment du diagnostic est de 60 ans. Le plus souvent, le cancer est découvert fortuitement, notamment à la faveur d’une échographie. Quand des symptômes sont détectés (dans 25% des patients), des métastases se sont souvent disséminées aux ganglions lymphatiques ou à d’autres organes. Une survie à cinq ans de 5% ou moins est observée quand des métastases sont présentes. A l’inverse, le taux de survie est de l’ordre de 90% quand la tumeur est détectée à un stade précoce et qu’une intervention chirurgicale est encore possible, car limitée à la capsule rénale.

Il est donc essentiel de trouver des marqueurs qui permettraient de diagnostiquer le cancer à un stade précoce, de prévoir les récidives éventuelles, voire de suivre l’effet des traitements. Un nombre limité d'études font état de diagnostic et/ou de protéines biomarqueurs pronostic précoce pour le carcinome rénal. Peu de ces études ont été réalisées par l'approche globale des protéines et à ce jour, aucun de ces marqueurs n’a été confirmé par d'autres groupes.

Nous avons précédemment montré que le profils des protéines exosomales urinaires est globalement stable sur trois mois (Bourderioux et al., 2014). Nous avons donc, pour cette étude, comparé le contenu protéique des exosomes urinaires de sept patients atteints de carcinome rénal à cellules claires avant et après intervention chirurgicale, chacun analysé individuellement par spectrométrie de masse à haute résolution.

Cette étude a mis en évidence 25 protéines surexprimées dans les exosomes urinaires de patients avant l’intervention chirurgicale. Ce panel permet également de distinguer les patients

atteints de cancer du rein de contrôles. Parmi ces 25 protéines, trois n'ont jamais été identifiées dans notre panel de sujets sains, et permettent de classer correctement cinq patients sur sept.

La suite de ce travail consistera dans la validation par Western blot de la surexpression de ces protéines dans des urines de patients supplémentaires, mais également le développement d'une méthode de protéomique ciblée pour la quantification absolue de notre panel.

Potential renal cancer diagnostic biomarkers by proteomics approach.

Bourderioux Matthieu[1]; Chhuon Cerina[2]; Nguyen-Khoa Thao[1,3]; Lipecka Joanna[2]; Méjean Arnaud[4]; Tondelier Danielle[1]; Jeanson Ludovic[5]; Rollet Virginie[6]; Escudier Estelle[5]; Escudier Bernard[7]; Edelman Aleksander[1]; Guerra Chiara[2]

[1]INSERM U1151, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

[2]Plateau Protéome Necker, PPN-3P5, SFR Necker, Inserm US24, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

[3]Laboratoire de Biochimie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

[4]Service d'urologie, hôpital Européen-Georges-Pompidou (HEGP), Paris, France.

[5]INSERM/UMR S933, Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France.

[6]CRCM, Service de Pneumo-Allergologie Pédiatriques, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

[7]Département de Médecine Oncologique, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France.

Abstract

Renal cancer accounts for 3% of malignant neoplasms in adults and it is mostly silent but often fatal when metastatic. Renal cancer is diagnosed mostly incidentally. Prognosis of metastatic renal cell carcinoma (RCC) is poor despite new targeted therapies, with a 5-year survival rate of 5% or less, while prognosis of localized RCC ranges from 70 to 95% when tumor is diagnosed at every early stage. Many studies have been conducted to search for protein biomarkers for RCC in biofluids and tissues, but none of the suggested proteins have proven so far to be a robust and specific biomarker on a larger scale.

We believe that the key to find pertinent markers is to investigate urinary exosome composition in these patients. Exosomes are vesicles released from the cells facing the urinary space and that carry molecular markers. We have previously demonstrated that the protein profiles in urinary exosomes are quite stables at a three months interval. On this basis, we hypothesized that exosomal protein profiles of patients before and after surgery should be globally the same, except for the proteins related to the rumor.

We collected urine from eight patients with clear cell RCC, planned to have nephrectomy to remove the tumor, before and after surgery. We isolated urinary exosomes and compare exosomes protein profiles pre and post-surgery by high resolution mass spectrometry, using label-free quantification.

Statistical analysis highlighted 25 upregulated proteins in urinary exosomes before surgery. ROC curve analysis and predicted class probability showed that this panel can distinguish renal cell carcinoma patients from control subject. Interestingly, among these 25 proteins, three have never been identified in the healthy controls. Moreover, bio-informatics analysis demonstrated that this subpanel of three proteins can correctly classify five patients over seven.

This study is a proof of concept that urinary exosomes can be a valuable source of biomarkers in the case of renal cancer. The differentially expressed proteins will be evaluated in a different set of patients by western blot. Future work is to develop a method for absolute quantification of this panel using targeted mass spectrometry.

Introduction

Renal cancer accounts for 3% of malignant neoplasms in adults. Incidence increases by about 2-3% yearly and, in 2009, it was 15.8 and 7.1 per 100 000 Europeans (males and females respectively). Renal cancer is diagnosed incidentally during abdominal imaging in a majority of cases. When symptomatically diagnosed (in 25% of patients), renal cancer has often metastasized to lymph nodes or other organs, or tumor is already large. Prognosis of metastatic renal cell carcinoma (RCC) is poor, with a 5-year survival rate of 5% or less. However, survival rate is much better, up to 90% when the tumor is detected early at the stage and curative surgery is still possible as it is still confined to the renal capsule. Thus, there is a crucial need for markers for early diagnosis.

A limited number of studies report early diagnosis and/or prognosis protein biomarkers for Renal Cell Carcinoma (RCC). Few of these studies were performed by global protein approach. Among them, one study (2D gels associated with MS analysis) led to identification of the 14-3-3 protein beta/alpha as differentially expressed protein in cyst fluids from RCC patients (Minamida et al., 2011). Another report proposes nicotinamide n-methyltransferase and enolase 2 as protein markers for renal cancer (Teng et al., 2011), after analysis of interstitial fluid by high throughput proteomics. Finally, urinary samples were screened for a set of known proteins by immunoblot detection, suggesting aquaporin 1 and perilipin-2 as prognostic markers for kidney cancer (Morrissey et al., 2010). Some studies conducted on renal cancer cell models pointed to the overexpression Cathepsin D (Vasudev et al., 2009). Other proposed urinary RCC markers include KIM-1 (Kidney injury molecule 1), LCN2 (Lipocalin-2) and MMP9 (Matrix metalloproteinase-9), NMP-22 (Nuclear mitotic apparatus protein 1) (Vasudev et al., 2009; Theodorescu et al., 2006; Schiffer et al., 2009; Motzer et al., 1996; Masui et al., 2013; Beasley et al., 2001). However, to date, none of these markers were confirmed by other groups.

Proteomics approaches are attractive for search of biomarkers, as they allow global and comparative analyses of proteins at different conditions. Recent advances in mass spectrometry allow precise, sensitive although not exhaustive, detection of proteins raising high expectations in the field of biomarkers coming from body fluids, especially blood and urine. The analysis of

serum proteome however remains very challenging due to (i) the wide dynamic range of proteins, (ii) the difficulty in finding low-abundance molecules amongst high-abundance serum proteins, and (iii) variations among individuals and paucity of reproducibility. Urines are also often chosen as biological fluid as the least invasive of all. However, urine proteomics is limited by the high amounts of degradation products of the extracellular matrix leading to the vast heterogeneous set of peptides from different collagen isoforms which tend to obscure other relevant endogenous peptide or protein identification by mass spectrometry (MS). The discovery of exosomes in body fluids has raised a new hope in search for diagnostic and/or prognostic biomarkers in different diseases. Exosomes are nanovesicles (ranging from 30 to 100 nm) formed during the internal budding of the late endosome (also called multivesicular bodies) secreted by all type of cell (Pisitkun et al., 2004). The protein, lipids and other molecules contained in exosomes are representative of the cell physiology at a given time (Pisitkun et al., 2004).

Urinary exosomes derive from the cells along the urinary tract and therefore could be of extreme interest in renal cancer. Increasingly, many groups are studying urinary exosomes by global approaches for biomarkers discovery, but most studies are conducted on pools of patients, while our show that patients should be analyzed individually (Bourderioux et al., 2014). The only published work on urinary exosomes analysis of RCC patients has been performed on a pool of patients versus a pool of control individuals and is not quantitative. The yield protein identification is low (186 proteins from urinary exosomes of RCC patients) and no statistical analysis was conducted. Nonetheless, in this work, previously known biomarkers (MMP9, Aquaporin 1, Carbonic anidrase IX) were verified by immunodetection confirming the suitability of urinary exosomes to search for RCC biomarkers.

We have previously shown that the urinary exosomal protein profile remains globally the same within 3 months (Bourderioux et al., 2014). Therefore, in this study we compare the urinary exosomes protein content before and after nephrectomy for 8 RCC patients, each analyzed in depth and individually.

Materials and methods

Urine Collection

All subjects provided written informed consent before the study. First morning void of urine (50 mL) was collected in a sterile container and mixed with an antiprotease cocktail (1.67 mL 100 mM NaN_3, 2.5 mL of 0.2 mg/mL PMSF, and 50 µL of 1 µg/mL leupeptin per 50 mL of urine(Zhou et al., 2006)) and frozen at −80 °C within 3 h after collection.

Exosome Preparation and fractionation

Exosomes were enriched using our previously published protocol (Bourderioux et al., 2014). Briefly, the urine sample mixed with antiproteases was centrifuged at 17 000 g for 30 min at 20 °C, the supernatant was ultracentrifuged at 200 000 g for 3 h at 20 °C on an XL-70 ultracentifuge (Beckman, CA, USA). The pellet was suspended in 300 µL of 200 mg/mL dithiothreitol (DTT) and heated at 37 °C for 30 min. The sample was complemented with 8 mL of "isolation solution" (250 mM sucrose, 10 mM triethanolamine, pH 7.6) and centrifuged at 200 000 g for 1.5 h at room temperature. Finally, the pellet was resuspended in 100 µL of 2 M urea for immunoelectrofocalisation (IEF) fractionation. Protein concentration was determined using the reducing agent and detergent compatible (RC-DC) assay (Bio-Rad, CA, USA). Samples were then stored and frozen at −80 °C until further experiments. Fifty to 120 µg of exosomal proteins obtained from urine were used for separation by isoelectric focusing (IEF) fractionation on an OFF-Gel 3100 fractionator (Agilent Technologies, CA, USA) by following manufacturer's instructions. The IEF was performed on 13 cm long immobiline strips, pH 3–10, in 12 fractions (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) by applying the standard protein separation OG12PR01 program (total final accumulated voltage is set at 20 000 V, current intensity is fixed at 50 µA, maximum voltage set to 4500 V, maximum power set at 200 mW).

Protein Digestion and MS analysis

After OFFgel, the 12 liquid fractions were precipitated with ethanol, centrifuged, and pellets were resuspended in Rapigest SF Surfactant 0.1% (Waters, MA, USA) and digested in-solution using a 1:50 trypsin-to-protein ratio (Guerrera et al., 2011). In parallel, the gel strip was cut into 12 fractions and also digested according to Jeanson et al(Jeanson et al., 2012). Peptides from the same fraction were pooled and desalted using C18 Zip tip (EMD Millipore, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were dried in a Speedvac and kept at −20 °C until MS analysis.

Dried peptides were resuspended in 10 µL of 10% acetonitrile (ACN), 0.1% TFA and analyzed on a nanoRSLC-Q Exactive PLUS (Dionex RSLC Ultimate 3000, Thermo Scientific, Waltham, MA). A 5 µL sample was preconcentrated on a 75 µm of i.d. reversed-phase (RP) trapping column and separated on a RP liquid chromatographic column (Pepmap C18, Dionex). Chromatography solvents were (A) 0.1% formic acid in water, and (B) 80% acetonitrile and 0.08% formic acid. Peptides were eluted from the column with the following gradient 5% to 35% B (58 min) and 40% to 80% (1 min). At 67 min, the gradient returned to 5% to re-equilibrate the column for 20 min before the next injection. Peptides eluting from the column were analyzed by data dependent MS/MS, using top-10 acquisition method. Briefly, the instrument settings were as follows: resolution was set to 70,000 for MS scans and 17,500 for the data dependent MS/MS scans in order to increase speed. The MS AGC target was set to 3.10^6 counts, whereas MS/MS AGC target was set to 5.10^4. The MS scan range was from 400 to 2000 m/z. MS and MS/MS scans were recorded in profile mode. Dynamic exclusion was set to 20 s duration.

MS Data Processing and Bioinformatic Analysis

The MS files were processed with the MaxQuant software version 1.5.2.8 and searched with the Andromeda search engine against the human UniProt database (Cox and Mann, 2008) (release 2014.07, 20 209 entries). To search for parent mass and fragment ions, we set an initial mass deviation of 4.5 ppm and 0.5 Da, respectively. The minimum peptide length was set to 7

amino acids, and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Carbamidomethylation (Cys) was set as fixed modification, whereas oxidation (Met) and N-acetylation were set as variable modifications. The false discovery rates (FDRs) at the protein and peptide level were set to 1%. The reverse hits and common contaminantswere removed from MaxQuant output. Proteins were quantified according to the MaxQuant label-free algorithm using LFQ intensities; both protein quantification and identification were obtained using at least two peptides per protein (Luber et al., 2010).

Bioinformatics analyses, including scatterplots, heatmaps, and clustering, were performed with Perseus software (version 1.5.0.31). LFQ intensities were log (base 2) transformed, then filtered to have at least five out of seven samples with valid values, in at least one of the two groups. Data were subsequently imputed to fill missing data points by creating a Gaussian distribution of random numbers with a standard deviation of 5% relative to the standard deviation of the measured values and a downshift of 3 to simulate the distribution of low signal values. For statistical comparison, we performed the equivalent of paired T test for patients before nephrectomy (BN) versus those same patients after nephrectomy (PN). Briefly, for each patient BN the values of the same patient PN where substracted, and a one sample-test for determining if the mean is significantly different from zero was performed. Hierarchical clustering of proteins that survived the test was performed in Perseus after z-score normalization of data.

To examine the sensitivity and specificity of those candidates biomarkers, and to identify the subpanel with maximum efficiency, a ROC (receiver operating characteristic) curves analysis was performed using the freely accessible web based application ROCCET (www.roccet.ca) (Xia et al., 2013). To study the prediction accuracy of a panel, we compared our RCC patients dataset on healthy subjects with previously published by us (Bourderioux et al., 2014). For each individual, the expression value of each protein was divided by the expression value of the exosomal protein Alix for normalization.

Results

Description of Patients

The description of RCC patients aged between 58 and 68 is presented in Table1 . The first morning void urines were collected from 8 patients on the day before nephrectomy (BN) and 2 to 176 days post nephrectomy (PN). Seven Patients were diagnosed with ccRCC and 1 with chromophobe RCC.

Ten control subjects (five females and five males) from a previous study (Bourderioux et al., 2014), ages ranging from 24–85 years, served as controls for the ROC curve analysis.

MS Analysis

Mass spectrometry analysis allowed the identification of up to 1846 proteins in the urinary exosomes of 8 RCC patients for a total of 3094 proteins identified across all samples (Figure 1, A; supplementary Table1). Of those, 188 proteins identified in every samples

We investigated the proximity of the protein profiles of the patients before and after nephrectomy (time interval spanning from 3 to 176 days). Correlation analysis by linear regression curve indicate that the urinary exosomal protein profiles for patients is similar for the patients RCC 2, 3, 5, 8, 1, 7 before and after surgery (R2>0.65) (Figure 1). The data from patient RCC4 were excluded from the statistical analysis due to their low correlation before and after surgery (R2=0.46) (Figure 1). Hierarchical analysis of the global quantitative protein profiles confirms the close proximity of RCC2, RCC3, RCC5 and RCC8 (dendrogram in Figure 1, panel C). No correlation between the closeness of the protein profile for each patient before and after surgery and the elapsed time between collects, the gravity or the relapse could be established.

Differential Protein Pattern in RCC patients before and after nephrectomy

We retained 892 for statistical analysis on 7 patients (supplementary Table 2). Comparison of exosomes of patients before and after nephrectomy highlighted 25 proteins significantly

different in abundance after nephrectomy for each patient. Interestingly, all of these 25 proteins were more abundant in patients before nephrectomy (Figure 2).

In order to assess the diagnostic power of the 25 proteins more abundant in the patients BN, we further decided to compare the abundance of these 25 proteins in urinary exosomes of healthy subjects analyzed a previous work to the urinary exosomes of ccRCC patients before nephrectomy. (Bourderioux et al., 2014).

We performed a multivariate ROC curve based exploratory analysis. ROC curve allows to calculate the area under the curve (AUC) which reflect the probability that a classifier will rank a randomly chosen positive sample higher than a randomly chosen negative one (Xia et al., 2013). Therefore, a perfect classifier will obtain AUC = 1 while a random classifier will obtain AUC close to 0.5. In contrast to univariate methods, multivariate analysis methods take into account all the features simultaneously and, consequently, they can identify relationship patterns between them. This kind of analysis can help to identify proteins that most probably could, as a panel, show a sensitivity and specificity as good as the whole panel. This analysis showed that a subpanel of 20 proteins presented an AUC of 0.99, while our complete panel showed an AUC of 0.988 (figure 3, panel A). As a result, this subpanel of 20 proteins could be more efficient at classifying the patients than the whole 25 proteins (Figure 3, panel B).

ROC analysis of the Differential Protein Pattern and assessment

Eight proteins were essential for the efficiency of the panel. Three of these proteins were of particular interest because they have never been identified in our cohort of healthy subjects: ST13 (Hsc70-interacting protein), C1QTNF5 (Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5) and STAM2 (Signal transducing adapter molecule 2) (Figure 4 panel A, B and C). To assess the sensitivity and specificity of the three proteins for classification of ccRCC patients, we performed receiver operating characteristic (ROC) analyses by comparing expression values in patients before nephrectomy *vs.* healthy subjects.

We firstly assessed if the ST13, C1QTNF5 and STAM2 alone would be sufficient to diagnose ccRCC patients by predicted class probability. The analysis showed a good prediction with only one patient wrongly predicted as “healthy” (figure 4, panel B). It is patient RCC2, for whom these three proteins were not identified.

Discussion

We have previously shown that the analysis of the urinary exosomes of each patient individually is more accurate than the analysis of a pool of patients (Bourderioux et al., 2014). Furthermore, we also observed, in healthy controls, that the urinary exosome protein profile is similar in time for the same person. On these bases we designed our experimental plan to compare each patient to himself before and after nephrectomy to obtain pertinent results through high statistical stringency. This has never been tried before for RCC patients.

To date, this work represents the most exhaustive exosomal protein profiling of RCC patients with globally 3094 proteins identified across 8 patients. We could observe a good correlation before and after nephrectomy for most patients although this correlation is lower than the one concerning healthy individuals (Bourderioux et al., 2014). This supports our assumption that small detectable changes before and after nephrectomy can be detected. Interestingly, our stringent statistical analysis highlighted only 25 proteins, all more abundant in the patients before nephrectomy. Changes in proteins abundance were not strikingly high, possibly because the signal from exosomes generated by the tumoral cells is diluted in the background of the exosomes generated by the normal epithelial cells in the patients. Further, in RCC we did not observe a clear strong inflammation signature like we identified in cystinuria patients, suggesting that the proteins identified present certain specificity.

The panel 25 of potential markers found to be more represented in the RCC patients before tumor removal could to be very stringent in separating ccRCC patients from Healthy individuals (AUC=0.99 of the ROC curve even with a subset of 20 proteins). This clearly requires to be verified on a much larger cohort of patients. These 25 proteins include 6 proteins that have

previously been associated with tumors and some more specifically with RCC. PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1), is disulfide reductase that participates in tumor angiogenesis and is regulated by MYC expression in ccRCC tissues (Tang et al., 2009). MFI2 (Melanotransferrin) is primarily associated with melanoma but is also found on lung, breast, ovarian, and renal cell carcinomas (Woodbury et al., 1980). ANXA5 (Annexin A5) has been found upregulated in RCC by 2D-PAGE based proteomic analysis of clear cell renal cell carcinoma biopsies (Sun et al., 2010). PKM (Pyruvate kinase PKM) has been reported in numerous studies as present at significantly higher levels of in renal cancer (Perroud et al., 2006; Wechsel et al., 1999). These findings have also been confirmed by transcriptomic data obtained in patients with clear cell renal cell carcinoma. mRNA expression of CPE (Carboxypeptidase E) was shown by microarray studies to be significantly elevated in renal clear cell tumor which has high metastatic potential, compared to adjacent normal tissue isolated from the same surgical samples (Lenburg et al., 2003). Gas6 (Growth arrest-specific protein 6) levels are elevated in patients with chronic renal failure and GAS6 is also activated by HIF-1 and HIF-2 in VHL-Deficient and Hypoxic Cancer Cells, mechanism also implicated in RCC (Tanaka et al., 2011; Lee et al., 2012; Rankin et al., 2014). FLOT2 expression level was higher in RCC tissues and cell lines than in corresponding adjacent normal tissues and its expression is an independent prognostic marker of overall RCC patient survival in a multivariate analysis (Yan et al., 2014).

We further explored the expression profiles for the proteins which were essential for the efficiency of the panel. ST13, STAM2 and C1QTNF5 were never identified in our healthy control cohort, either because they are not present in the healthy people of they are expressed at much lower level undetectable by mass spectrometry.

ST13, Hsc70-interacting protein (Hip or CHIP) is a ubiquitous chaperon associated protein, that can be phosphorylated and that is involved in EGFR signaling. More precisely, Hsc70-interacting protein (CHIP), acts as a chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase and plays a crucial role in ubiquitination of Her-2/neu, a coreceptor of EGFR highly expressed in breast cancer. CHIP is therefore involved in the down-regulation of Her-2/neu. Furthermore, ST13 has been identified as a specific antigen for Anti- Renal carcinoma (NY-REN-33) (Scanlan et al., 1999).

STAM2, Signal transducing adapter molecule 2 (also known as Hrs-binding protein), is involved in intracellular signal transduction mediated by cytokines and growth factors being involved in down-regulation of receptor tyrosine kinase via multivesicular body (MVBs) when complexed with HGS (ESCRT-0 complex). The HGS binds ubiquitin and acts as sorting machinery that recognizes ubiquitinated receptors and transfers them to further sequential lysosomal sorting/trafficking processes (Berlin et al., 2010). STAM2 is overexpressed in gastrointestinal stromal tumors (Džombeta et al., 2014). Interestingly, also VTA1, one of the essential proteins of the biomarkers panel is involved in the sorting and down-regulation of EGFR.

C1QTNF5, Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5 (CTRP5), is a protein that carries mutations responsible for late-onset retinal macular degeneration disease (Jacobson et al., 2014). C1QTNF5 is a secreted and membrane-associated protein involved in adhesion of retinal pigmented epithelial cells (Mandal et al., 2006). The presence of C1QTNF5 in the kidney has only been reported in podocyte derived exosomes (Prunotto et al., 2013), suggesting that the expression level of C1QTNF5 in healthy individuals is very low and undetectable without enrichment.

Some potential urinary biomarkers proposed in the literature KIM1, NMP22 and PLIN2 (Perilipin-2) could not be assessed in this study because these proteins were not identified (Vasudev et al., 2009; Theodorescu et al., 2006; Schiffer et al., 2009; Motzer et al., 1996; Bonventre, 2008; Morrissey et al., 2011). Other potential markers like AQP1, MMP9 and LCN2 were identified in this study but they didn't not pass our statistical filters. Nonetheless, they all show a tendency to be over represented before vs after nephrectomy in a limited number of patients: MMP9 is strongly more expressed in 3 out or 7 RCC patients, AQP1 only in RCC8, the only patient diagnosed with chromophobe RCC, LCN2 in 4 out of 7 RCC patients. One potential urinary biomarker identified by proteomics approaches through the analysis of whole urine of RCC patients, 14-3-3 alpha/beta (Minamida et al., 2011), was also identified and found differential in this study for 5 out of 7 RCC patients ($p=0.029$, while our filter was set to $p<0.01$).

Figures

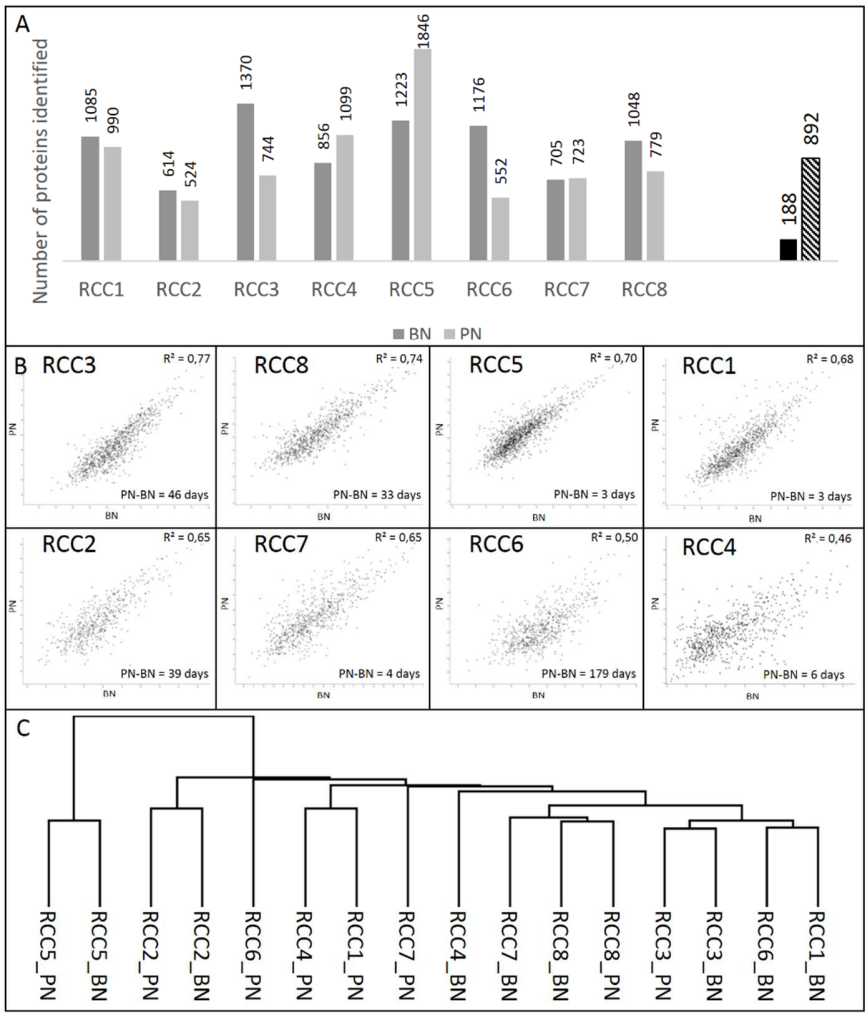


Figure 1: Before and after nephrectomy comparison of the protein profiles of each patients.

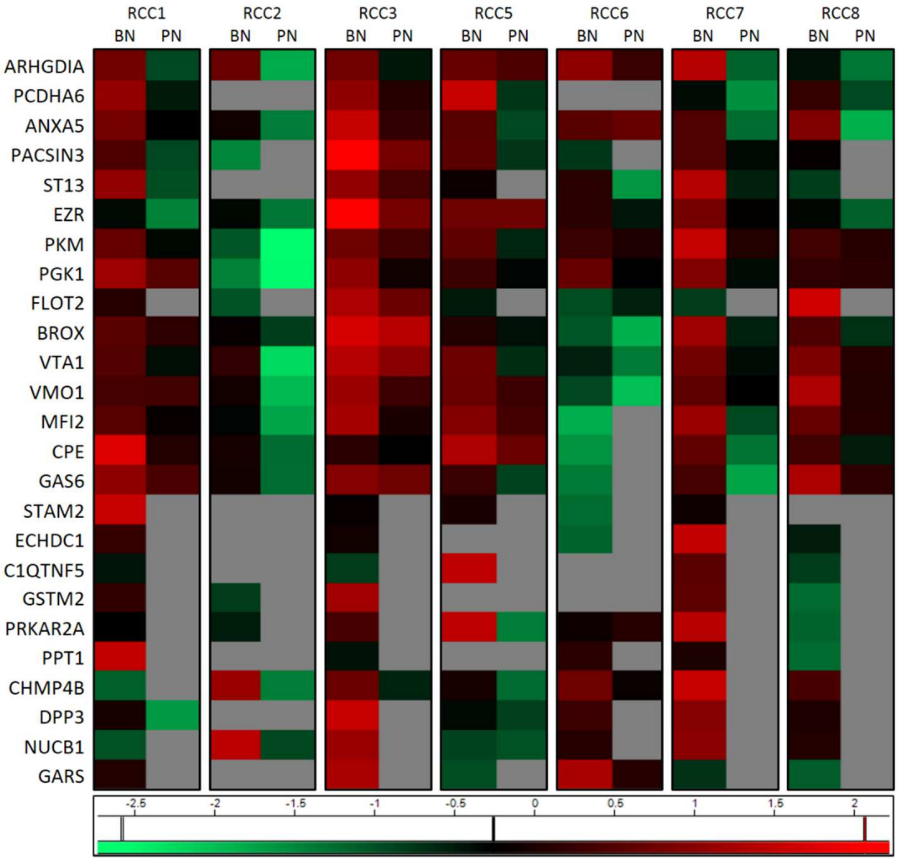


Figure 2: Heatmap of the 25 more abundant proteins in RCC patients before nephrectomy.

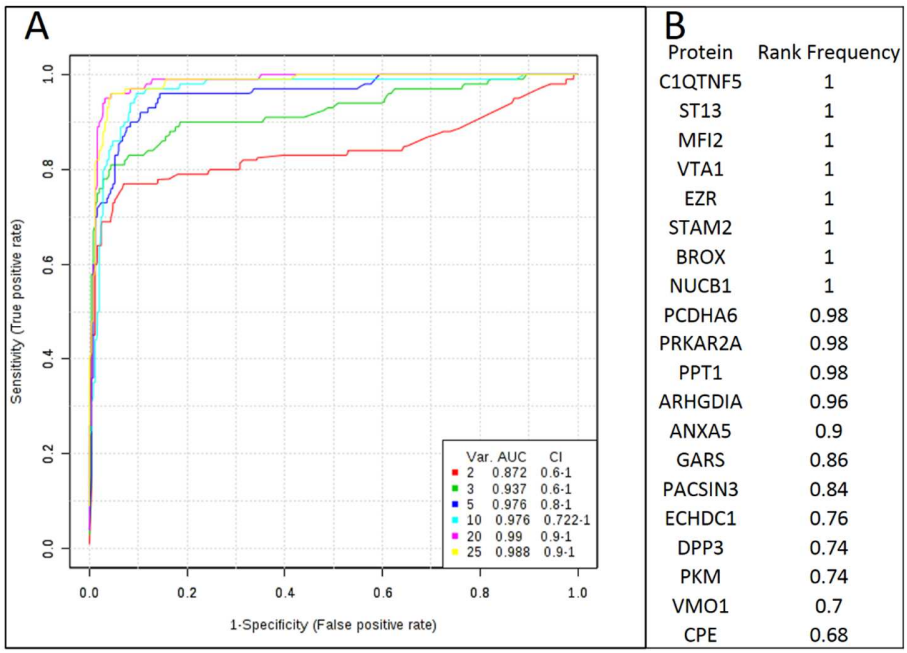


Figure 3: Multivariate ROC curve based exploratory analysis performed on the 25 differentially expressed proteins.

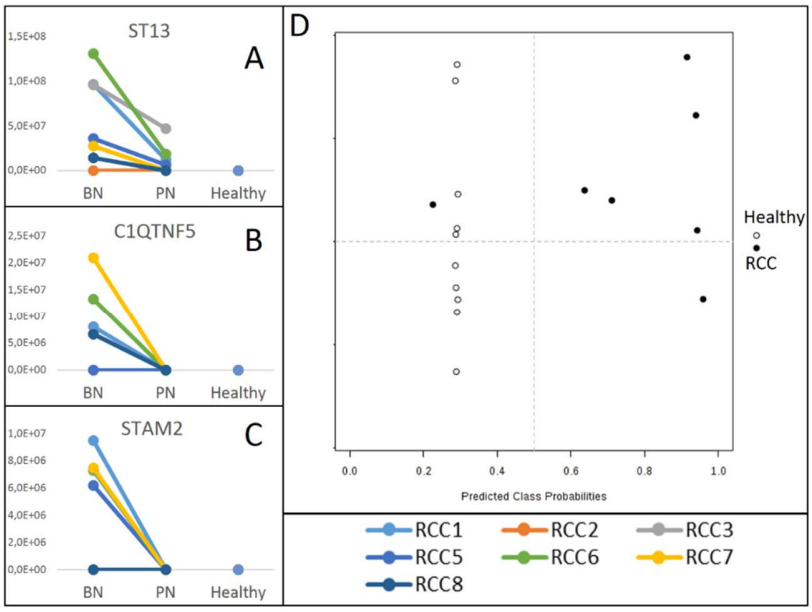


Figure 4: Graphic representation of the expression value of the three proteins in patients before nephrectomy and never identified in our control subjects and predicted class probabilities of a model using the three proteins.

TABLES

Patient	Sexe	Age	Cancer type	TNM	Surgery	Collection date		time gap PN-BN	Exosomal protein per ml of urine µg/mL	N of Exosomal Proteins	Date of last news	Relapse
RCC1	M	58	ccRCC	T1aN0M0	Partial	BN	08/06/2010	3 days	1.4	1236	10/11/2014	No
						PN	11/06/2010		3.6	1096		
RCC2	F	66	ccRCC	T2N0M1	Total	BN	22/12/2011	38 days	2.7	702	05/06/2015	with disease
						PN	30/01/2012		7.5	617		
RCC3	M	63	ccRCC	T1aN0M1	Total	BN	05/04/2013	46 days	1.1	1514	25/05/2015	with disease
						PN	21/05/2013		0.5	933		
RCC4	M		ccRCC	T1aNxMo G2	Partial	BN	25/06/2010	6 days	9.7	880	03/03/2015	No
						PN	01/07/2010		2.7	1137		
RCC5	M		ccRCC	T1aNxMo G2	Partial	BN	25/06/2010	3 days	nd	1402	10/11/2013	No
						PN	28/06/2010		nd	1821		
RCC6	M	68	ccRCC	T1aNxM0 G2	Partial	BN	20/04/2012	176 days	6.1	1322	11/06/2015	No
						PN	16/10/2012		0.3	696		
RCC7	M		ccRCC	T1bNxMoG2	Total	BN	21/06/2010	4 days	0.8	857	10/04/2015	No
						PN	25/06/2010		17.9	874		
RCC8	F		chromophobe	T3a	Total	BN	15/06/2010	2 days	1.2	1174	08/11/2012	No
						PN	17/06/2010		3.2	903		

Table 1 : Description of renal cell carcinoma patients.

Associated content

Supplementary table 1: table of the 3094 proteins identified in all eight patients by mass spectrometry

Supplementary table 2: table of the 892 proteins that passed filters for statistical analysis

Acknowledgements

The authors thank the proteomic core facilty of the Université Paris-Descartes.

Legends and titles

Figure 1: A) Histogram of proteins identified in 8 CC patients before nephrectomy (BN), and several days after nephrectomy (PN). B) Scatter plots of identified proteins in urinary exosomes of 8 ccRCC patients. In each plot, a dot represent a protein with its intensity in the patient BN (in abscissa), and PN (in ordinate). The more the two analysis are close to each other, the more the distribution will be close to a curve with slope equal to one and R^2 close to one. C) Dendrogram obtained on the 8 RCC patients after mass spectrometry analysis.

Figure 2: Heatmap of the 25 more abundant proteins in RCC patients before nephrectomy. Each column represents a patient, with the expression value of the proteins before and after nephrectomy. Lower and higher value than the mean are represented in green and red, respectively. Gray value are for not identified, or not quantified proteins.

Figure 3: A) Multivariate ROC curve based exploratory analysis showing the different AUC depending on how many proteins are selected to form a subpanel. The model using 20 features (20 proteins) showed an AUC of 0,99 while the whole panel showed an AUC of 0,988. B) Table showing the 20 proteins most frequently selected and most “important” for the model using 20 features.

Figure 4: A-C) Graphic representation of the expression value of the three proteins in patients before nephrectomy and never identified in our control subjects. D) Predicted class probabilities of a model using the three proteins.

Table 1: Description of renal cell carcinoma patients. TNM: Tumor Node Metastasis; PN: Post-nephrectomy; BN: before nephrectomy; M: Male; F: Female; ccRCC: clear cell Renal Cell Carcinoma.

Supplementary table 1: table of the 3094 proteins identified in all eight patients by mass spectrometry.

Supplementary table 2: table of the 892 proteins that passed filters for statistical analysis with their LFQ expression value log 2 transformed. Values with an asterisk have been imputed for statistical analysis. Proteins with p-values lower than 0.05 are in bold, and proteins with p-values lower than 0.01 are underlined.

Bibliography

Beasley, N.J., Wykoff, C.C., Watson, P.H., Leek, R., Turley, H., Gatter, K., Pastorek, J., Cox, G.J., Ratcliffe, P., and Harris, A.L. (2001). Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density. Cancer Res. *61*, 5262–5267.

Berlin, I., Schwartz, H., and Nash, P.D. (2010). Regulation of epidermal growth factor receptor ubiquitination and trafficking by the USP8·STAM complex. J. Biol. Chem. *285*, 34909–34921.

Bonventre, J.V. (2008). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl. *241*, 78–83.

Bourderioux, M., Nguyen-Khoa, T., Chhuon, C., Jeanson, L., Tondelier, D., Walczak, M., Ollero, M., Bekri, S., Knebelmann, B., Escudier, E., et al. (2014). A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients. J. Proteome Res.

Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat. Biotechnol. *26*, 1367–1372.

Džombeta, T., Kapuralin, K., Ulamec, M., Tomas, D., Gajović, S., and Krušlin, B. (2014). Immunohistochemical expression of STAM2 in gastrointestinal stromal tumors. Anticancer Res. *34*, 2291–2296.

Guerrera, I.C., Ollero, M., Vieu, D.-L., and Edelman, A. (2011). Quantitative differential proteomics of cystic fibrosis cell models by SILAC (stable isotope labelling in cell culture). Methods Mol. Biol. Clifton NJ *742*, 213–225.

Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Sumaroka, A., Roman, A.J., and Wright, A.F. (2014). Late-onset retinal degeneration caused by C1QTNF5 mutation: sub-retinal pigment epithelium deposits and visual consequences. JAMA Ophthalmol. *132*, 1252–1255.

Jeanson, L., Kelly, M., Coste, A., Guerrera, I.C., Fritsch, J., Nguyen-Khoa, T., Baudouin-Legros, M., Papon, J.-F., Zadigue, P., Prulière-Escabasse, V., et al. (2012). Oxidative stress induces unfolding protein response and inflammation in nasal polyposis. Allergy *67*, 403–412.

Lee, I.J., Hilliard, B., Swami, A., Madara, J.C., Rao, S., Patel, T., Gaughan, J.P., Lee, J., Gadegbeku, C.A., Choi, E.T., et al. (2012). Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) levels are elevated in patients with chronic renal failure. Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. *27*, 4166–4172.

Lenburg, M.E., Liou, L.S., Gerry, N.P., Frampton, G.M., Cohen, H.T., and Christman, M.F. (2003). Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. BMC Cancer *3*, 31.

Luber, C.A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O'Keeffe, M., et al. (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. Immunity *32*, 279–289.

Mandal, M.N.A., Vasireddy, V., Reddy, G.B., Wang, X., Moroi, S.E., Pattnaik, B.R., Hughes, B.A., Heckenlively, J.R., Hitchcock, P.F., Jablonski, M.M., et al. (2006). CTRP5 is a membrane-associated and secretory protein in the RPE and ciliary body and the S163R mutation of CTRP5 impairs its secretion. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *47*, 5505–5513.

Masui, O., White, N.M.A., Desouza, L.V., Krakovska, O., Matta, A., Metias, S., Khalil, B., Romaschin, A.D., Honey, R.J., Stewart, R., et al. (2013). Quantitative proteomic analysis in metastatic renal cell carcinoma reveals a unique set of proteins with potential prognostic significance. Mol. Cell. Proteomics MCP *12*, 132–144.

Minamida, S., Iwamura, M., Kodera, Y., Kawashima, Y., Tabata, K., Matsumoto, K., Fujita, T., Satoh, T., Maeda, T., and Baba, S. (2011). 14-3-3 protein beta/alpha as a urinary biomarker for renal cell carcinoma: proteomic analysis of cyst fluid. Anal. Bioanal. Chem. *401*, 245–252.

Morrissey, J.J., London, A.N., Luo, J., and Kharasch, E.D. (2010). Urinary biomarkers for the early diagnosis of kidney cancer. Mayo Clin. Proc. Mayo Clin. *85*, 413–421.

Morrissey, J.J., London, A.N., Lambert, M.C., and Kharasch, E.D. (2011). Sensitivity and specificity of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 for the diagnosis of renal cell carcinoma. Am. J. Nephrol. *34*, 391–398.

Motzer, R.J., Bander, N.H., and Nanus, D.M. (1996). Renal-cell carcinoma. N. Engl. J. Med. *335*, 865–875.

Perroud, B., Lee, J., Valkova, N., Dhirapong, A., Lin, P.-Y., Fiehn, O., Kültz, D., and Weiss, R.H. (2006). Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. Mol. Cancer *5*, 64.

Pisitkun, T., Shen, R.-F., and Knepper, M.A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 13368–13373.

Prunotto, M., Farina, A., Lane, L., Pernin, A., Schifferli, J., Hochstrasser, D.F., Lescuyer, P., and Moll, S. (2013). Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine. J. Proteomics *82*.

Rankin, E.B., Fuh, K.C., Castellini, L., Viswanathan, K., Finger, E.C., Diep, A.N., LaGory, E.L., Kariolis, M.S., Chan, A., Lindgren, D., et al. (2014). Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 13373–13378.

Scanlan, M.J., Gordan, J.D., Williamson, B., Stockert, E., Bander, N.H., Jongeneel, V., Gure, A.O., Jäger, D., Jäger, E., Knuth, A., et al. (1999). Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *83*, 456–464.

Schiffer, E., Vlahou, A., Petrolekas, A., Stravodimos, K., Tauber, R., Geschwend, J.E., Neuhaus, J., Stolzenburg, J.-U., Conaway, M.R., Mischak, H., et al. (2009). Prediction of muscle-invasive bladder cancer using urinary proteomics. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 4935–4943.

Sun, C.Y., Zang, Y.C., San, Y.X., Sun, W., and Zhang, L. (2010). Proteomic analysis of clear cell renal cell carcinoma. Identification of potential tumor markers. Saudi Med. J. *31*, 525–532.

Tanaka, T., Kitamura, H., Torigoe, T., Hirohashi, Y., Sato, E., Masumori, N., Sato, N., and Tsukamoto, T. (2011). Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *137*, 789–794.

Tang, S.-W., Chang, W.-H., Su, Y.-C., Chen, Y.-C., Lai, Y.-H., Wu, P.-T., Hsu, C.-I., Lin, W.-C., Lai, M.-K., and Lin, J.-Y. (2009). MYC pathway is activated in clear cell renal cell carcinoma and essential for proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells. Cancer Lett. *273*, 35–43.

Teng, P., Hood, B.L., Sun, M., Dhir, R., and Conrads, T.P. (2011). Differential proteomic analysis of renal cell carcinoma tissue interstitial fluid. J. Proteome Res. *10*, 1333–1342.

Theodorescu, D., Wittke, S., Ross, M.M., Walden, M., Conaway, M., Just, I., Mischak, H., and Frierson, H.F. (2006). Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. Lancet Oncol. *7*, 230–240.

Vasudev, N.S., Sim, S., Cairns, D.A., Ferguson, R.E., Craven, R.A., Stanley, A., Cartledge, J., Thompson, D., Selby, P.J., and Banks, R.E. (2009). Pre-operative urinary cathepsin D is associated with survival in patients with renal cell carcinoma. Br. J. Cancer *101*, 1175–1182.

Wechsel, H.W., Petri, E., Bichler, K.H., and Feil, G. (1999). Marker for renal cell carcinoma (RCC): the dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK). Anticancer Res. *19*, 2583–2590.

Woodbury, R.G., Brown, J.P., Yeh, M.Y., Hellström, I., and Hellström, K.E. (1980). Identification of a cell surface protein, p97, in human melanomas and certain other neoplasms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *77*, 2183–2187.

Xia, J., Broadhurst, D.I., Wilson, M., and Wishart, D.S. (2013). Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. Metabolomics *9*, 280–299.

Yan, Y., Yang, F.-Q., Zhang, H.-M., Che, J., and Zheng, J.-H. (2014). Up-regulation of flotillin-2 is associated with renal cell carcinoma progression. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *35*, 10479–10486.

Zhou, H., Yuen, P.S.T., Pisitkun, T., Gonzales, P.A., Yasuda, H., Dear, J.W., Gross, P., Knepper, M.A., and Star, R.A. (2006). Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. Kidney Int. *69*, 1471–1476.

Article 3: “Comparative proteomics of respiratory exosomes of cystic fibrosis patients”

Introduction

La mucoviscidose (MV) est une maladie génétique à transmission autosomique récessive létale due à des mutations dans le gène *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). L’atteinte pulmonaire, qui est décisive pour le pronostic, est hétérogène et son mécanisme d’extension pendant l’enfance est encore méconnu. Les exosomes sont des nanovésicules d’origine endosmale secrétées par tous les types cellulaires, et dont l’implication dans la communication intercellulaire et la signalisation cellulaire a intéressé de nombreux groupes ces dernières années. Récemment, leur rôle dans le processus inflammatoire chez des patients ayant une maladie pulmonaire a été démontré. Notre hypothèse est que les exosomes respiratoires peuvent participer à l’extension précoce des lésions pulmonaire chez les patients MV.

Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient (1) de confirmer la présence d’exosomes dans les lavages broncho-alvéolaire de patients MV ; (2) de caractérisé ces exosomes ; (3) de comparer les profils protéiques des patients MV à des asthmatiques.

Méthodes

Des exosomes ont été isolés des LBA de trois patients MV, sept patients asthmatiques et six patients avec d’autres maladies pulmonaire (dyskinésie ciliaire primitive, trachéomalacie), par ultracentrifugations différentielles. La caractérisation des exosomes a été réalisée par microscopie immunoélectronnique et Western blot dirigé contre des protéines exosomales spécifiques. Les profils protéiques exosomaux ont été obtenus par spectrométrie à haute résolution, et quantifiés par « label-free ».

Résultats

Nous avons démontré la présence d'exosomes à la fois dans les LBA des patients MV et non-MV. Les marqueurs protéiques exosomaux CD9, ALIX, CD63 et flotillin-1 ont été détectés en microscopie électronique et Western blot. Les résultats obtenus en spectrométrie de masse semblent révéler une signature protéique différentielle, avec 53 protéines dont l'expression est significativement altérée chez les patients MV. Parmi elles, 52 protéines sont surexprimées dans les exosomes de patients MV et font majoritairement partie de six classes protéiques (activité hydrolase, réponse immunitaire, activité hydrolase, liaison aux récepteurs, transport ioniques, histones). Finalement, nous avons également démontré la présence d'exosomes dans les surnageants de cellules épithéliales pulmonaires cultivées en interface air-liquide afin de mimer un épithélium.

Conclusions

Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude démontrant la présence d'exosomes dans le LBA de patients MV. La détection d'une expression différentielle de protéines connues pour leur implication dans la MV suggère que l'analyse des exosomes peut être utile pour l'étude de la physiopathologie de la maladie.

Comparative proteomics of respiratory exosomes in cystic fibrosis

Bourderioux, Matthieu [1]; Rollet-Cohen, Virginie [1, 2]; Nguyen-Khoa, Thao [3, 1]; Chhuon, Cerina [4]; Guérin-Pfyffer, Sophie [2]; Lipecka, Joanna [5]; Hatton, Aurélie [1]; Schmitt, Alain [6]; Guerrera, Ida Chiara [4]; Sermet-Gaudelus, Isabelle [1, 2]; Edelman, Aleksander [1]

INSTITUTIONS :

1. Inserm U1151, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.
2. CRCM, Service de Pneumo-Allergologie Pédiatriques, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.
3. Laboratoire de Biochimie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.
4. Plateau Protéome Necker, PPN-3P5, SFR Necker, Inserm US24, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.
5. Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Inserm U894, Paris, France.
6. Plateforme microscopie électronique, Inserm U1016, Institut Cochin, Cnrs UMR 81044, Université Paris Descartes, Paris, France.

Abstract

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is a lethal recessive autosomal genetic disorder caused by mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene CF lung disease, which makes the prognosis of the disease, is heterogeneous, and the mechanism of its extension during childhood is unclear. Exosomes are membrane nanovesicles of endosomal origin secreted by all cell types, known to play a role in the intercellular communication and cell signaling. Recently, implication of respiratory exosomes from patients with inflammatory pulmonary disease has been demonstrated in the proinflammatory processus. Our hypothesis is that respiratory exosomes can be involved in the early extension of the lung damage in CF

Objectives

The aims of this study were (1) to assess the presence of exosomes in bronchoalveolar lavage fluid from CF patients; (2) to characterize these exosomes; (3) to compare the exosome protein profiles of CF patients to asthma patients.

Methods

Exosomes were isolated from BALF of 3 CF patients, 7 patients with asthma, and 6 patients with other pulmonary diseases (primary ciliary dyskinesia, tracheomalacia), by differential centrifugations. Characterization of exosomes was realized by immunoelectron microscopy and western blot with antibodies against known exosomal markers. Exosomal protein profiles were obtained by high resolution mass spectrometry with label-free quantification.

Results

We demonstrated presence of exosomes in the BALF of both CF and non CF patients by approaches mentioned in Methods. The following exosomal protein markers were detected: CD9, ALIX, CD63, flotillin-1. Mass spectrometry preliminary results point to a different exosomal protein profile between CF patients and asthmatic subjects, highlighting 53 proteins whose expression is significantly different in exosomes isolated from BALF CF. Among them, 52 proteins are upregulated in exosomes from CF patients, and fall mainly in six protein classes (hydrolase activity, immune response, peroxidase activity, receptor binding, ion transfer/transport,

histones). Interestingly, we also showed presence of exosomes in supernatant from respiratory epithelial cells cultured in air liquid interface.

Conclusions

This is the first study demonstrating the presence of exosomes in BALF of CF patients. The differential protein profile of CF exosomes suggests that it reflects the physiopathology of the disease.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is a lethal recessive autosomal genetic disorder caused by mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. CF is a multisystemic disease which affects sweat glands, pancreas, intestine and airways. CF lung disease, which makes the prognosis of the disease, is often clinically silent during childhood. However, structural lung abnormalities as bronchiectasis appear as early as three months, and extend progressively (Sly et al., 2013) They reflect the progression of inflammation as assessed by high level of elastase evidenced in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of CF infants. Very interestingly, CF lung injury is heterogeneous as some segments can be preserved for a long time. The mechanism of the extension of the disease is unclear. This probably relies on numerous signaling pathways for inflammation and intracellular communication.

Exosomes are membrane nanovesicles secreted by all cell types, formed by inward budding of the membrane of the late endosomes, and released by cells after fusion with the plasma membrane. Exosomes encompass soluble and membrane proteins, lipids, mRNAs, miRNAs, and other cytosolic molecules. It has been shown that exosomes are mediators of cell signaling by allowing binding of exosomal membrane proteins to receptors (Nolte-’t Hoen et al., 2009), fusion of the exosome with receptor cell (Mathivanan et al., 2010) or cleavage of exosomal membrane proteins to activate signaling pathways (Zakharova et al., 2007).

Implication of respiratory exosomes has already been demonstrated in inflammatory pulmonary diseases. Respiratory exosomes have been described in BALF in healthy patients (Admyre et al., 2003), patients with sarcoidosis (Qazi et al., 2010), and asthma (Torregrosa

Paredes et al., 2012)(Levänen et al., 2013a). Very interestingly, the authors successfully demonstrated that respiratory exosomes induced significantly higher IL-8 production in respiratory epithelial cells, and suggested that exosomes may be involved in the initiation and progression of the inflammation in the lung. Our hypothesis is that respiratory exosomes can be involved in the early extension of the lung damage in CF.

Proteomic technics are useful approaches for investigating the physiopathology of cystic fibrosis (Jeanson et al., 2014). Several studies have been conducted on BALF from CF patients, highlighting an altered expression of components of the immune response and proteolytic activity (Gharib et al., 2009). However, proteomic analysis of BALF is impaired by highly abundant proteins derived from the diffusion through alveolar capillary barrier. The analysis of exosomes by proteomics could overcome this issue by enrichment of low abundance components that couldn't be detected in the whole body fluid (Zhou et al., 2006)**.** Respiratory exosomes have never been investigated in BALF of patients with cystic fibrosis. We have recently developed a robust and reproducible protocol for urinary exosome isolation and were able to highlight, by proteomics, an inflammatory signature in patients with a genetic disease (Bourderioux et al., 2015).

The aims of this study were (1) to assess the presence of exosomes in BALF from CF patients; (2) to characterize these exosomes; (3) to compare the exosome protein profiles of CF patients to asthma patients.

Materials and methods

Study subjects and collection of BALF

All patients were recruited from the pediatric pulmonology department in hospital Necker-Enfants Malades, France, from january to june 2015. All bronchoscopies with BAL were performed for routine care investigation (severe asthma exploration, bacteriological documentation), or therapeutic intervention (bronchoaspiration). All subjects provided informed consent.

Bronchoscopy was carried out under general anesthesia with a flexible fiberoptic bronchoscope, wedged in a bronchus for instillation of a sterile saline solution at 37°C (3 mL/kg).

BALF was collected by aspiration. One tablet of protease inhibitors cocktail (complete Mini, Roche Applied Science, Penzbergn Germany) was added for 10 mL of fluid. Fluid was then centrifuged at 700*g* for 10 min at 4°C; supernatant was frozen at -80°C within one hour after collection.

Exosome isolation from BALF and from epithelial cells

Exosomes were isolated from BALF by differential ultracentrifugations (Levänen et al., 2013b). Briefly, BALF was centrifuged at 3,000 *g* for 30 minutes to remove cell debris. Next the supernatant was centrifuged at 10,000 *g* for 30 minutes at 4°C. The resulting supernatant was filtered through a 0.2-µm filter, followed by an ultracentrifugation at 200,000 *g* for 2 hours at 4°C (XL-70 ultracentifuge, Beckman, CA, USA) to pellet the exosomes. The pellet was dissolved in PBS and the concentration of exosomal proteins was determined using DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were then stored and frozen at −80 °C until further experiments.

Exosomes were isolated from epithelial bronchial cells CFBE-WT cell lines, cultured in air-liquid interface to mimic the pulmonary epithelium.(Gruenert et al., 1995) These cells were cultured in Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS); 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin (15140, Invitrogen), and grown in the presence of 600 µg/ml hygromycin B to select for clones of cells that contained the transfected plasmid.

For air-liquid interface cultures, cells were plated in (F-C-A)-coated permeable Transwell® cell culture inserts (Corning Incorporated) at a density of 1 x10^6 cells/cm^2 that were used 15 to 25 days after growing in air/liquid conditions, to form well-differentiated, polarized cultures that resemble in vivo pseudo-stratified mucociliary epithelium.

Exosomes were sampled by incubating 200µL of medium (MEM, hygromycin B 6µL/mL) at the apical surface of reconstituted epithelium for 24 hours, and collecting daily the apical supernatant for 5 days. Exosomes from supernatant were isolated by successive centrifugations as described by Théry et al (Théry et al., 2006). The pellet was dissolved in PBS and the exosomal protein content was measured by DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules,CA, USA)

according to the manufacturer's instructions. Samples were then stored and frozen at - 80 °C until further experiments

Electron and immunoelectron microscopy

Immunoelectron microscopy for specific exosomes markers was performed according to Pisitkun et al (Pisitkun et al., 2004). Briefly, the samples were mixed with 4% paraformaldehyde (in PBS, pH 7.4) in a 1:1 ratio. Two hundred mesh nickel grids were floated on a droplet of the sample for 10 min at room temperature. After being blocked with 1% BSA and washed with PBS, the grids containing the exosomes were incubated with primary antibody for 45 min at room temperature. For ALIX ((Purified Mouse Anti-AIP1, 611620, BD Transduction Laboratories, NJ, USA) and CD9 (C-4, Santa Cruz Biotechnology), primary antibodies were mixed with 0.02% Triton X-100, to permeabilize the vesicle membranes. Grids were exposed to primary antibodies recognizing CD63 at 1/100th, ALIX at 1/100th, or CD9 1/100th and then were exposed to species-specific anti-IgG antibodies conjugated to colloidal gold particles (6 nm) (British Biocell International).

For electron microscopy analysis, the grids were washed on a PBS droplet for 5 min twice and subsequently on water for 5 min twice. The sample was negatively stained by floating grids on droplets of 1% uranyl acetate for 1 min. After drying, the grids were examined with a JEOL 1011 electron microscope operated at 80 kV. Many fields were captured in order to have a good overview of the disparity in diameter of the isolated structures. Acquired images were analyzed using ImageJ 1.47v (freely available at http://imagej.nih.gov/ij/).

Statistical analysis

Mean values (SEM) were used for normally distributed data and otherwise median (IQ) values. Unpaired t tests were performed on normally distributed data to identify significant differences between experimental groups, the Mann–Whitney U test was used for not normally distributed groups. P-values were considered significant at <0.05. Statistical analyses were made

with software GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Immunoblotting

Exosomes (30 to 60 µg depending on sample protein concentration) were loaded in 10% SDS-PAGE and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Tris glycin buffer, 85mA, overnight, 4°C). Next, the membranes were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) and probed with anti-ALIX at 1/200th (Purified Mouse Anti-AIP1, 611620, BD Transduction Laboratories, NJ, USA), anti-flotillin1 at 1/500th (Purified Mouse anti-flotillin-1, BD Transduction Laboratories, NJ, USA) ,anti-CD9 at 1/200th (C-4, Santa Cruz Biotechnology) or anti-CD63 at 1/100th (H-193, Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies. The blots were incubated with IRDye 680RD goat antirabbit (926−68071, Li-Cor Biosciences, NE, USA) or IRDye 800CW goat antimouse (926−32210, Li-Cor Biosciences) secondary antibodies at 1/5000th and were visualized using the Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences).

Sample preparation for mass spectrometry

The volume corresponding to 10 µg of exosomal proteins was complemented to 20 µL with PBS 1X and sonicated for 10 minutes. Filter Aided Sample Preparation (FASP) was used for protein digestion (Wiśniewski et al., 2009). Briefly, proteins were reduced in 100 mM DTT for 30 min at 60°C, mixed with 8 M urea buffer, loaded on Microcon 30kDa centrifugal filters (Millipore) and alkylated with 50 mM iodoacetamide. Filters were washed twice with 8 M urea and twice with 50 mM ammonium bicarbonate. Following an overnight trypsin digestion at 37°C, samples were vacuum dried, and kept at −20 °C until MS analysis.

Mass spectrometry analysis: LC-MS/MS acquisition

Dried peptides were resuspended in 50 µL of 10% acetonitrile (ACN), 0.1% TFA. For each run, 5 µl (corresponding approximately to 1 µg) were injected in a nanoRSLC-Q Exactive PLUS (Dionex RSLC Ultimate 3000, Thermo Scientific, Waltham, MA). Peptides were separated on a reversed-phase liquid chromatographic column (Pepmap C18, Dionex). Chromatography solvents were (A) 0.1% formic acid in water, and (B) 80% acetonitrile and 0.08% formic acid. Peptides were eluted from the column with the following gradient 5% to 40% B (120 min) and 40% to 80% (1 min). At 125 min, the gradient returned to 5% to re-equilibrate the column for 20 min before the next injection. One blank with two 30 minutes linear gradients was run between triplicates to prevent sample carryover. Peptides eluting from the column were analyzed by data dependent MS/MS, using top-10 acquisition method. Briefly, the instrument settings were as follows: resolution was set to 70,000 for MS scans and 17,500 for the data dependent MS/MS scans in order to increase speed. The MS AGC target was set to 3.10^6 counts, whereas MS/MS AGC target was set to 5.10^4. The MS scan range was from 400 to 2000 m/z. MS and MS/MS scans were recorded in profile mode. Dynamic exclusion was set to 20 s duration. Each sample was analyzed in three technical triplicates by nanoLC/MS/MS.

MS data processing and bioinformatic analysis

Raw MS files were processed with the MaxQuant software version 1.5.2.8 and searched with the Andromeda search engine against the human UniProt database (release july 2014, 20 210 entries). To search for parent mass and fragment ions, we set the mass deviation of 4.5 ppm and 20 ppm, respectively. The minimum peptide length was set to seven amino acids and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Carbamidomethylation (Cys) was set as fixed modification, whereas oxidation (Met) and N-term acetylation were set as variable modifications. The false discovery rates (FDRs) at the protein and peptide level were set to 1%. Scores were calculated in MaxQuant as described previously (Cox and Mann). The reverse and common contaminants hits were removed from MaxQuant output. Proteins were quantified according to the MaxQuant label-free algorithm using LFQ intensities, protein quantification was obtained using at least two peptides per protein.

Statistical and bioinformatic analysis, including heatmaps, profile plots, and clustering, were performed with Perseus software (version 1.5.0.31) freely available at www.perseus-framework.org. For statistical comparison, we set two groups, CF and asthma patients, each containing biological and technical triplicates, and we then filtered the data to keep only proteins with at least five valid values out of ten. Next, the data were imputed to fill missing data points by creating a Gaussian distribution of random numbers with a standard deviation of 33% relative to the standard deviation of the measured values and 1.8 standard deviation downshift of the mean to simulate the distribution of low signal values. We performed a *t* test, and retained only proteins with a p-value lower than 0.01. Hierarchical clustering of proteins that survived the test was performed in Perseus on logarithmized LFQ intensities after z-score normalization of the data, using Euclidean distances using default parameters.

Protein class attribution was performed using the freely available online application enrichment analysis from the gene ontology consortium (http://geneontology.org/) and PANTHER classification system (http://pantherdb.org).

Results

Description of patients

The description of patients is presented in Table 1. BALF of 16 patients (age range 10 months-14 years) have been collected: 3 patients with cystic fibrosis, seven patients with asthma, and six patients with other pulmonary diseases (OPD): primary ciliary dyskinesia, post infectious bronchopneumopathy and tracheomalacia. The three patients with cystic fibrosis presented typical cystic fibrosis, with a moderate lung disease (FEV1 respectively 92, 103% and 70% for patients CF1, CF2 and CF3). BALF were realized for bronchoaspiration (patient CF1, allergic bronchopulmonary aspergillosis) or bacteriological documentation (patients CF2 and CF3). One patient was collected twice (CF1 and CF1bis). Diagnosis of asthma was supported by repeated wheezing episodes and/or positive metacholin test and/or response to treatment by inhalated corticosteroid. All asthmatic patients received inhalated corticosteroids. Three patients presented confirmed primary ciliary dyskinesia, two patients had post-infectious

bronchopneumopathy, and one patient tracheomalacia. Cytology of these BALF showed a frequent hypercellularity (n=12/16), defined by cellularity superior to 300 000/mL, with a constant excess of neutrophils (>2%). Microbiological analysis revealed presence of microorganism (>10^4 CFU/mL) in nine patients.

For mass spectrometry analysis, we analyzed exosomes from the four BALF samples of the three CF patients, and the six BALF of the asthma patients.

Exosome characterization

Nanovesicles isolated from the BALF of CF, asthma and OPD patients were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). A typical "cupshape" aspect in the 20−100 nm range was observed for every patient (figure 1 A, B, C).

We then analyzed the size distribution of respiratory exosomes observed by measuring the size of exosomes on several images for each patient, in order to be representative of the global distribution (mean = 38 exosomes measured per patient (10-83)). We observed that the exosomes isolated from BALF of CF patients (mean = 48 nm) were significantly smaller (figure 1, D) than the exosomes isolated from BALF of asthma (mean = 112 nm) or OPD patients (mean=98 nm).

Interestingly, the yield of proteins extracted form respiratory exosomes in CF patients was significantly higher than that of the asthma and OPD patients.

BALF exosomes protein composition

We then performed immunostaining on respiratory exosomes and observed them by TEM. We were able to validate that the respiratory exosomes isolated from BALF of CF (Figure 2, A, B, C) and asthma patients (Figure 2, D, E, F) harbor the three classical exosomal proteins ALIX, CD63 and CD9. Moreover, we separated exosomal proteins by SDS-PAGE and detected known exosomal proteins by western blot against Flotillin-1, CD9 and CD63 in CF, asthmatic and OPD patients (figure 2, G).

Exosome characterization in CFBE-WT cells (figure 3)

We analyzed the exosomes issued from CFBE-WT epithelial bronchial cells cultured in air-liquid interface to mimic the pulmonary epithelium. The exosomes isolated from CFBE cells presented the expected « cupshape » by TEM analysis (fig 3 A, zoomed in 3 B). The size distribution is similar to the one obtained from CF patients. Further studies are being undertaken to compare the exosomes issued from CFBE cells containing the CFTR DelF508 to the cells containing CFTR WT. The presence of exosomal markers (ALIX, CD9, CD63) was confirmed by immunoelectron microscopy.

Mass spectrometry analysis

Mass spectrometry analysis allowed the identification of up to 898 proteins in the respiratory exosomes of four CF and six asthma patients for a total of 1100 proteins identified across all samples (Figure 4; supplementary Table 1). No significant difference in the number of proteins identified was detected.

We retained 633 proteins for statistical analysis (supplementary Table 2). Comparison of respiratory exosomes of CF vs asthma patients highlighted 53 proteins whose expression is significantly different in exosomes isolated from CF BALF. Interestingly, almost all of these proteins were more abundant in CF patients, and only B galactosidase was downregulated (Figure 5). Biclustering analysis shows that the 53 proteins separate clearly CF from asthmatic patients (Figure 5).

These proteins fall mainly in six classes depending on their molecular activity or involvement in biological process. The profile of the intensity of these proteins in each patient is reported in figure 6. The name of the proteins associated to each class is reported in table 2.

Discussion

In this study, we demonstrate for the first time that exosomes are present in the BALF of CF patients and in the supernatant of respiratory cell lines. Previous studies already reported microparticles in sputum (Porro et al., 2010) of CF patients.

We also show a higher number of exosomes in CF BALF than in asthma or other diseases. Previous studies showed increased levels of exosomes in sarcoidosis (Qazi et al., 2010) but not in asthma (Torregrosa Paredes et al., 2012). Porro et al also showed higher number of exosomes in CF sputum comparison with other patients. This may be linked to different explanations: first, the quantity of exosomes is evaluated by colorimetric protein assays, which could introduce a bias. Indeed, the observation of an elevation of the protein content could be due to other protein contamination, for example by mucins, whose level is elevated in cystic fibrosis (Henderson et al., 2014), and which have already been observed as the exosomes surface (Kesimer and Gupta, 2015). The second possibility is that exosomes could be released in larger quantities because of their role in the disease, as demonstrated in inflammation, such as sepsis (Mostefai et al., 2008), preeclampsia (Meziani et al., 2006), metabolic syndrome (Agouni et al., 2008), pulmonary arterial hypertension (Tual-Chalot et al., 2010) , and malaria (Couper et al., 2010). The last hypothesis is that exosomes may also originate both from respiratory cells or from neutrophils, which are in excess in these patients due to the chronic infection (Conese et al., 2003), and therefore be over represented. A study showed recently that exosomes from CF patients sputum were predominantly originating from granulocyte, support this hypothesis (Porro et al., 2010).

This question will be resolved, in the future, by using the Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), a technology for visualizing and analyzing particles in liquids that relates the rate of Brownian motion to particle size.

Proteomics could in part answer to this question. Indeed, proteomics analysis of BALF from CF patients shows the presence of proteins stemming from pulmonary epithelium, as collectins, pulmonary surfactant-associated proteins A-B-D synthetized by alveolar epithelial cells and club cells, or the sodium transporter SLC34A2, expressed at the apical surface of the lung

epithelium. This suggests that some exosomes are released by pulmonary epithelial cells. However, an important number of identified proteins, and especially among the upregulated proteins, are proteins of the neutrophilic signature (ELANE, MPO, LCN2), suggesting that isolated exosomes are also released by neutrophils. Origin of exosomes is probably mixed, from epithelial cells and from neutrophils.

Interestingly, biclustering analysis shows that the 53 proteins separate clearly CF from asthmatic patients, which demonstrates real differences in protein composition of exosomes between these two chronic pulmonary inflammatory diseases. In contrast to asthma, hallmarks of the lung disease in cystic fibrosis (CF) patients are a persistent infection with opportunistic bacterial pathogens, an abnormal inflammatory response dominated by polymorphonuclear neutrophils and the dysregulation of the redox balance (Ziady and Hansen, 2014)

Indeed we found that proteins involved in immune response and peroxidation (myeloperoxydase, peroxyredoxine) were overrepresented in CF, The surexpression of proteins with an hyrolase activity, and particulary proteases (cathepsins, neutrophil elastase) and proteases inhibitors (antileukoproteinase, leucocyte elastase inhibitor) could be explained by the imbalance between proteases and protease inhibitors, another actor of the inflammation in cystic fibrosis. Among the receptor binding proteins, calgranulins expressed by the neutrophils (S100-A8, S100-A9, S100-A12) are also over represented. Those proteins are known to have a proinflammatory role in many inflammatory diseases, such as cystic fibrosis, *via* the activation of the proinflammatory NFκB pathway.(Kang et al., 2015). Elevated levels of calprotectin (S100A8/S100A9) have already been measured in BALF (MacGregor et al., 2008), sputum (Gray et al., 2008), and blood (Gray et al., 2010) of CF patients, and appear as a potential risk marker for exacerbation and/or lung function decline (Reid et al., 2015).

Previous proteomic studies were performed in the respiratory epithelium. Gharib et al. (2009) compared the BALF (whole body fluid) protein profiles of 8 adult cystic fibrosis subject and 4 adult healthy volunteers free of lung diseases. They identified 896 distinct proteins in BALF from

CF and/or control subjects. Gene ontology analysis of differentially expressed proteins indicated altered expression of components of the immune response and proteolytic activity.

The success of exosomes isolation from CFBE-WT is a promising result. Quantitative proteomics of *in vitro* bronchial epithelial secretome has already been reported., indicating an altered innate immunity, suggesting that downstream consequences of mutant CFTR set the stage for chronic inflammation and infection in CF airways (Peters-Hall et al., 2015).

The next step will be to test the capacity of reintegration of WT exosomes in CF epithelial cells, in the hope to restore chloride channel function of these cells, by integration of a functional CFTR protein, transferred via the exosomes. The potential of transfer of a functional protein CFTR by microparticles has already been successfully demonstrated. (Gonzalez et al., 2012). It could be represent a new therapeutic approach in the management of cystic fibrosis.

Alternatively we will also test the modification of the inflammatory pattern induced by the CF exosomes in WT epithelium. Indeed in a primary epithelia culture from asthma patients, it was shown that application of exosomes induced the secretion of proinflammatory cytokines, such as IL8. Similarly, injection of CF sputum exosomes to CF mice, induced a proinflammatory signal (Porro et al., 2013).

To our knowledge, this is the first study demonstrating the presence of exosomes in BALF of CF patients and airway surface liquid of respiratory cells. The differential protein profile of CF exosomes suggests indeed that it reflects the physiopathology of the disease.

Figures

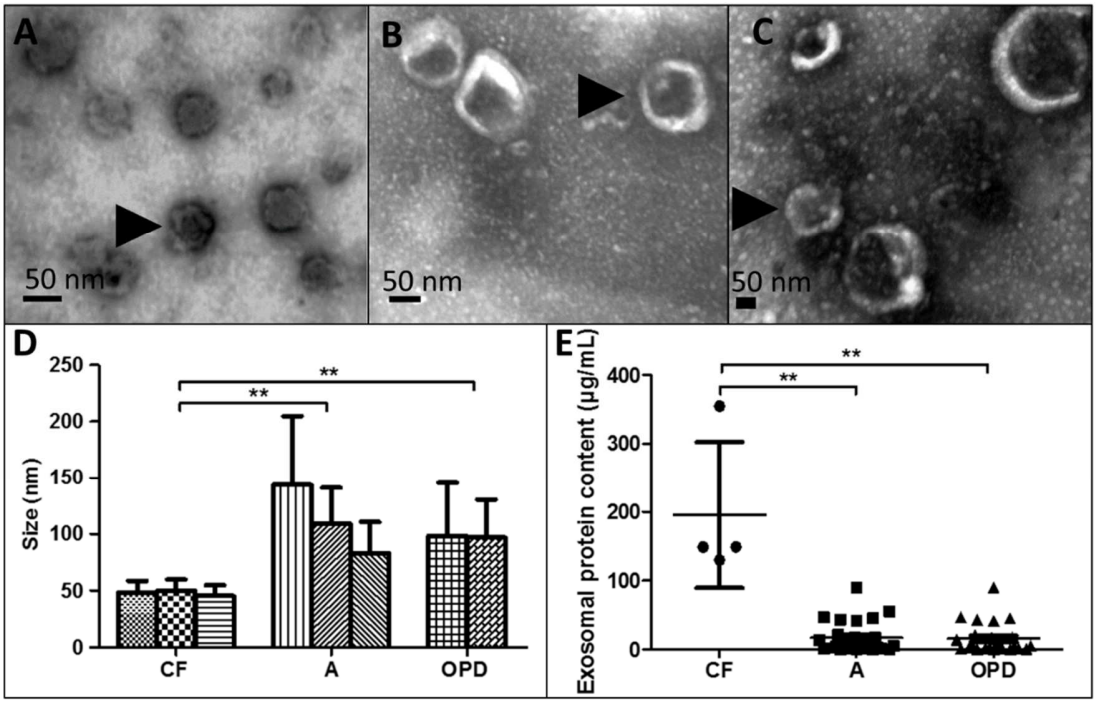


Figure 1: BALF exosomes characterization

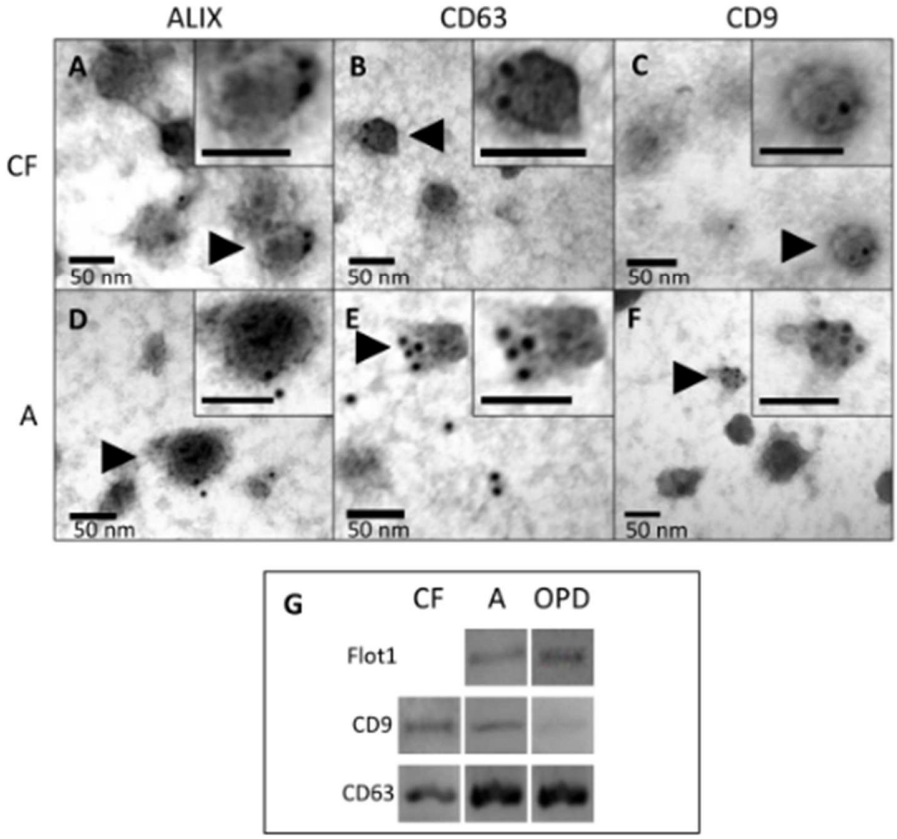


Figure 2: BALF exosomes biochemical composition

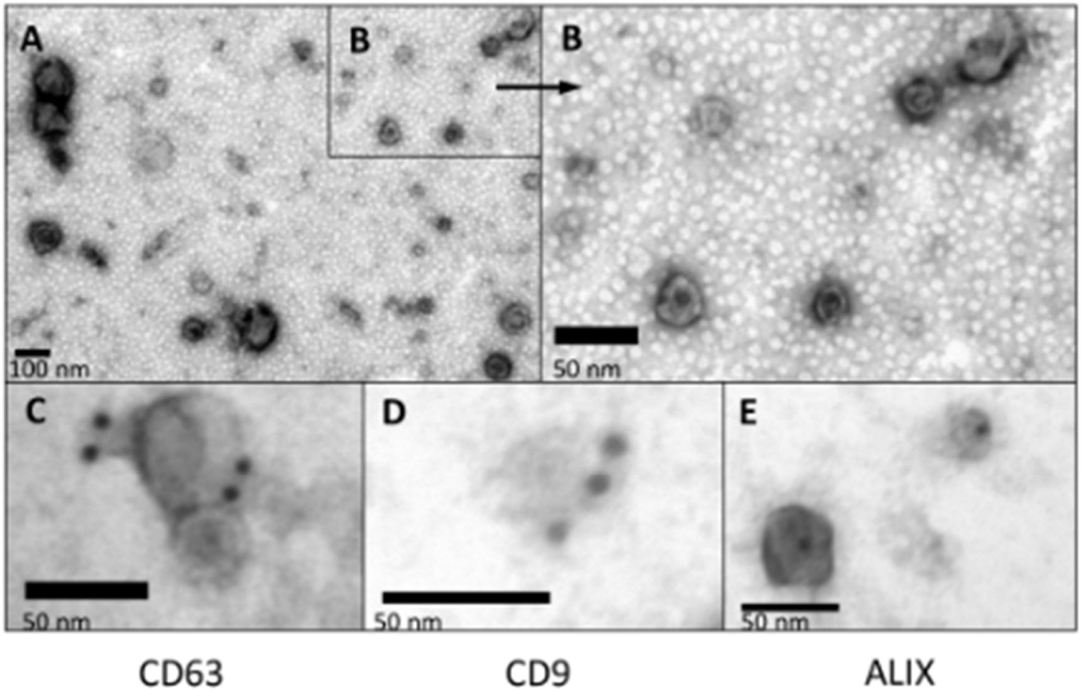


Figure 3: CFBE-WT exosomes characterization

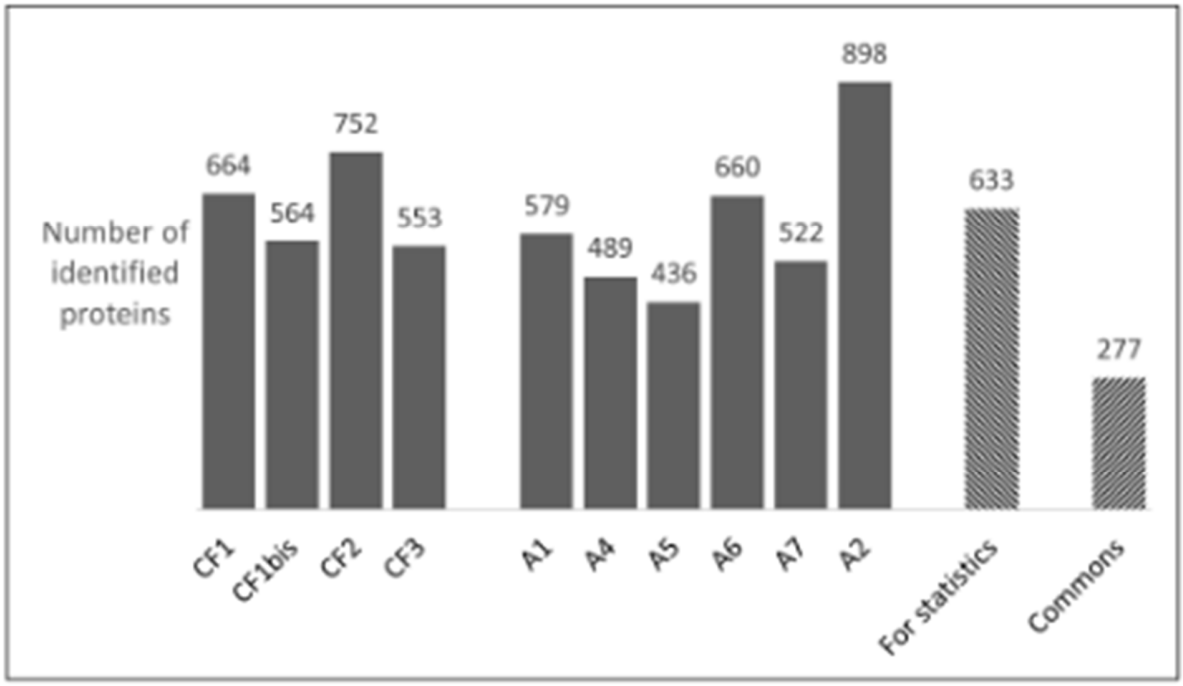


Figure 4: Number of proteins identified by mass spectrometry in exosomes from BALF

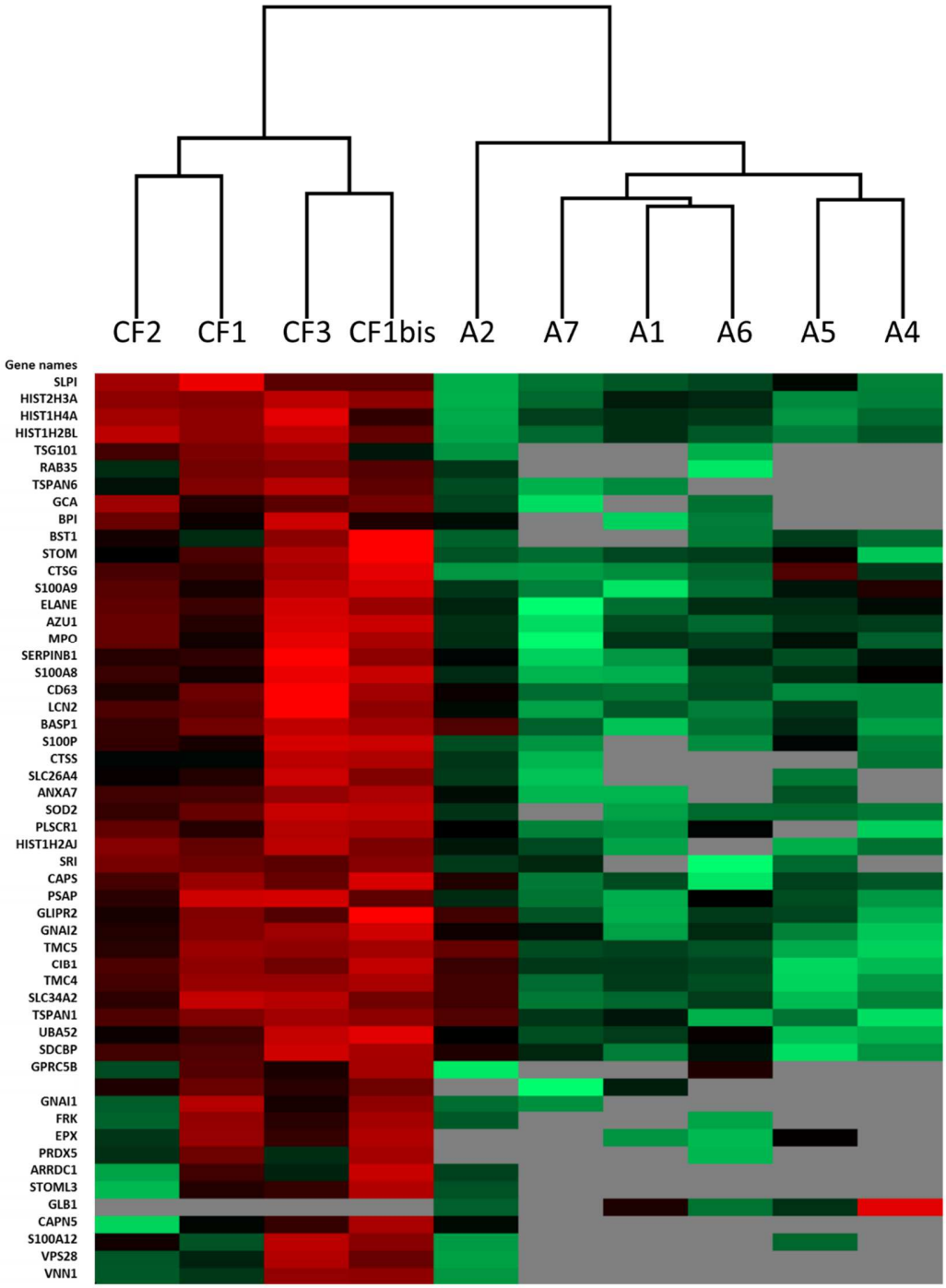


Figure 5: Heatmap of exosomal proteins differentially expressed between CF and asthmatic patients

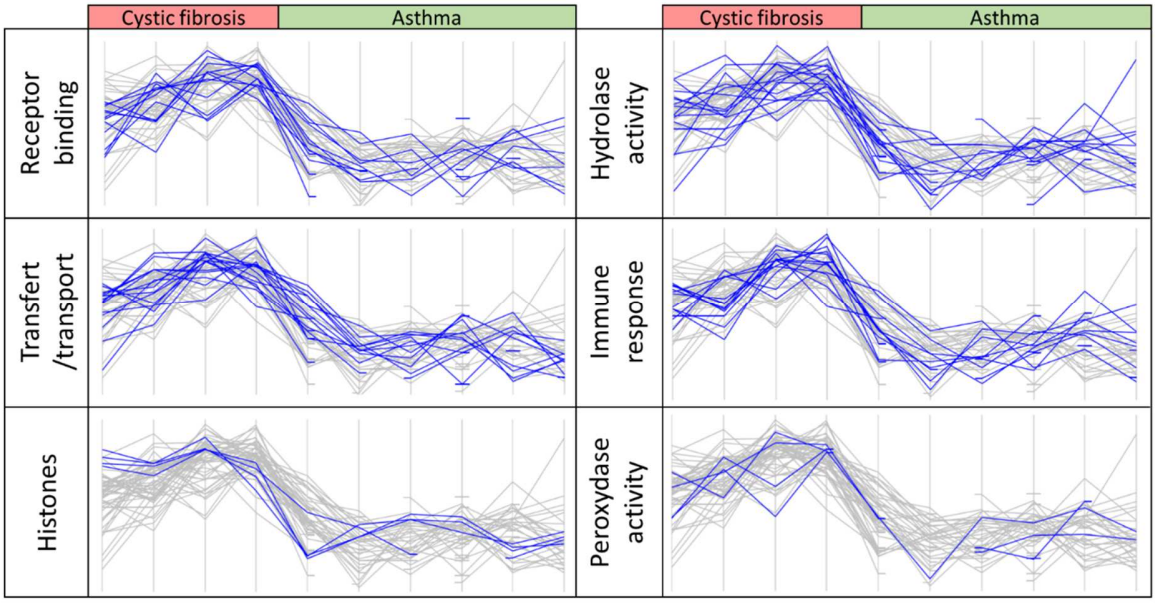


Figure 6: Profile plot of the most respresentated protein classes

Tables

Disease	N° patient	Age (year)	Gender	BALF			
				cell count (/mL)	neutrophils (%)	macrophages (%)	identified microorganism(s)
Cystic fibrosis	CF1/CF1bis	7	M	2 000 000	49	48	*Escherichia coli*
	CF2	1	M	790 000	ND	ND	*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*
	CF3	11	M	850 000	86	14	*Bordetella bronchiseptica*
Asthma	A1	9	F	500 000	ND	ND	none
	A2	0,85	F	40 000	24	75	*Moraxella catarrhalis*
	A3	1	M	500 000	61	39	*Staphylococcus aureus*
	A4	3	M	630 000	32	65	none
	A5	9	F	610 000	28	78	none
	A6	5	M	500 000	49	47	*Haemophilus influenzae*
	A7	3	F	50 000	ND	ND	*Moraxella catarrhalis*
Other pulmonary diseases	OPD1	4	F	300 000	20	79	none
	OPD2	10	F	2 000 000	91	8	*Streptococcus penumoniae*
	OPD3	10	F	100 000	57	43	none
	OPD4	14	F	230 000	73	20	none
	OPD5	10	F	480 000	54	45	none
	OPD6	5	F	500 000	93	4	*Haemophilus influenzae*

Table 1: Description of patients

		Receptor binding	Hydrolase activity	immune system process	Transfert transport	Histone	Peroxydase activity
Calcyphosin	**CAPS**	■			■		
Protein S100-A12	**S100A12**	■		■			
Protein S100-A9	**S100A9**	■		■			
Tetraspanin-1	**TSPAN1**	■		■			
Tetraspanin-6	**TSPAN6**	■		■			
CD63 antigen	**CD63**	■					
Tyrosine-protein kinase FRK	**FRK**	■					
G-protein coupled receptor family C group 5 member B	**GPRC5B**	■					
Protein S100-A8	**S100A8**	■					
Protein S100-P	**S100P**	■					
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	**GNAI1**	■	■				
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	**GNAI2**	■	■				
Azurocidin	**AZU1**		■	■			
ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2	**BST1**		■	■			
Cathepsin G	**CTSG**		■	■			
Cathepsin S	**CTSS**		■	■			
Calpain-5	**CAPN5**		■				
Calcium and integrin-binding protein 1	**CIB1**		■				
Neutrophil elastase	**ELANE**		■				
Grancalcin	**GCA**		■				
Beta-galactosidase	**GLB1**		■				
Leukocyte elastase inhibitor	**SERPINB1**		■				
Antileukoproteinase	**SLPI**		■				
Sorcin	**SRI**		■				
Pantetheinase	**VNN1**		■				
Prosaposin	**PSAP**		■		■		
Eosinophil peroxidase	**EPX**			■			■
Myeloperoxidase	**MPO**			■			■
Bactericidal permeability-increasing protein	**BPI**			■	■		
Phospholipid scramblase 1	**PLSCR1**			■	■		
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	**GLIPR2**			■			
Brain acid soluble protein 1	**BASP1**				■		
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	**LCN2**				■		
Ras-related protein Rab-35	**RAB35**				■		
Syntenin-1	**SDCBP**				■		
Pendrin	**SLC26A4**				■		
Sodium-dependent phosphate transport protein 2B	**SLC34A2**				■		
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	**STOM**				■		
Stomatin-like protein 3	**STOML3**				■		
Transmembrane channel-like protein 4	**TMC4**				■		
Transmembrane channel-like protein 5	**TMC5**				■		
Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	**VPS28**				■		
Histone H2A type 1-J	**HIST1H2AJ**					■	
Histone H2B type 1-L	**HIST1H2BL**					■	
Histone H4	**HIST1H4A**					■	
Histone H3.2	**HIST2H3A**					■	
Peroxiredoxin-5, mitochondrial	**PRDX5**						■
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	**SOD2**						■
Annexin A7	**ANXA7**						
Arrestin domain-containing protein 1	**ARRDC1**						
Tumor susceptibility gene 101 protein	**TSG101**						
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	**UBA52**						

Table 2: Proteins associated to each class

Associated contents

Supplementary table 1 : table of the 1100 proteins identified in all ten patients by mass spectrometry

Supplementary table 2 : table of the 633 proteins that passed filters for statistical analysis

Acknowledgements

The authors thank the proteomic core facilty of the Université Paris-Descartes, and the FERCM (Fonds d'Etudes et de Recherche du Corps Médical) for the financial support.

Legends and titles

Figure 1 : Transmission electron microscopy (TEM) of isolated exosomes in BALF from patients with cystic fibrosis (A), asthma (B) and other pulmonary diseases (C).The triangles point to structures that correspond to the "cup-shape" specific exosomes as described elsewhere. (D): Size means of BALF exosomes on patients of the three groups, observed by TEM and measured using the ImageJ software. (E): Total exosomal protein content in BALF from patients with cystic fibrosis (CF, n=4), asthma (A, n= 12), and other pulmonary disease (OPD, n=10) determined using the Dc protein assay. Results are shown in µg BALF exosomes/mL of collected BALF

Figure 2 : Immunoelectron micoscopy on exosomes probed with antibodies directed against exosomal markers (CD9, ALIX, CD63), in patients with cystic fibrosis (CF) and asthma (A). Black dots

represent the gold particle coupled to secondary antibody. Black bars denote 50 nm . The triangles point to the structure zoomed in squares (A to F)

(G) : WB analysis of different exosomal proteins : Flotillin (Flot 1, 47 kDa), CD9 antigen (CD9, 25 kDa) and CD63 antigen (CD63, 25 kDa), in patients with cystic fibrosis (CF), asthma (A) and other pulmonary diseases (OPD)

Figure 3 : TEM of exosomes isolated from supernatant of CFBE-WT (A, zoom in B). Immunoelectron micoscopy on exosomes probed with antibodies directed against exosomal markers CD9, CD63 and ALIX (C,D,E).

Figure 4 : Histogram showing the number of proteins that were identified and quantified by mass spectrometry in exosomes isolated from BALF of cystic fibrosis (CF) or asthma (A) patients. The black bar show the number of proteins that were retained for the statistical test.

Figure 5 : Clustering and heat map of exosomal proteins differentially expressed in cystic fibrosis versus asthma patients. Heat map obtained by comparing 52 significantly more abundant proteins, and one downregulated proteins in cystic fibrosis patients. Lower and higher value than the mean are represented in green and red, respectively. Gray value are for not identified, or not quantified proteins.

Figure 6 : Profile plot of the six most represented protein classes in the 52 upregulated proteins in exosomes isolated from BALF of CF patients.

Table 1 : Description of patients. M : male/F : female. Detection threshold of microorganism is 10^4 UFC/mL.

Table 2 : List of the 52 proteins upregulated in exosomes from BALF from CF ptients, with their protein classe(s)

Supplementary table 1 : table of the 1100 proteins identified in all ten patients by mass spectrometry

Supplementary table 2 : table of the 633 proteins that passed filters for statistical analysis. Proteins with p-values in bold are lower than 0.05, while underlined p-values are lower than 0.01.

References

Admyre, C., Grunewald, J., Thyberg, J., Gripenbäck, S., Tornling, G., Eklund, A., Scheynius, A., and Gabrielsson, S. (2003). Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. Eur. Respir. J. *22*, 578–583.

Agouni, A., Lagrue-Lak-Hal, A.H., Ducluzeau, P.H., Mostefai, H.A., Draunet-Busson, C., Leftheriotis, G., Heymes, C., Martinez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2008). Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. Am. J. Pathol. *173*, 1210–1219.

Bourderioux, M., Nguyen-Khoa, T., Chhuon, C., Jeanson, L., Tondelier, D., Walczak, M., Ollero, M., Bekri, S., Knebelmann, B., Escudier, E., et al. (2015). A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients. J. Proteome Res. *14*, 567–577.

Conese, M., Copreni, E., Di Gioia, S., De Rinaldis, P., and Fumarulo, R. (2003). Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc. *2*, 129–135.

Constantinescu, A.A., Gleizes, C., Alhosin, M., Yala, E., Zobairi, F., Leclercq, A., Stoian, G., Mitrea, I.L., Prévost, G., Toti, F., et al. (2014). Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. *13*, 219–226.

Couper, K.N., Barnes, T., Hafalla, J.C.R., Combes, V., Ryffel, B., Secher, T., Grau, G.E., Riley, E.M., and de Souza, J.B. (2010). Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to

malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. PLoS Pathog. *6*, e1000744.

Gharib, S.A., Vaisar, T., Aitken, M.L., Park, D.R., Heinecke, J.W., and Fu, X. (2009). Mapping the Lung Proteome in Cystic Fibrosis. J. Proteome Res. *8*, 3020–3028.

Gonzalez, G., Vituret, C., Di Pietro, A., Chanson, M., Boulanger, P., and Hong, S.-S. (2012). Microparticle-mediated transfer of the viral receptors CAR and CD46, and the CFTR channel in a CHO cell model confers new functions to target cells. PloS One *7*, e52326.

Gray, R.D., Imrie, M., Boyd, A.C., Porteous, D., Innes, J.A., and Greening, A.P. (2010). Sputum and serum calprotectin are useful biomarkers during CF exacerbation. J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc. *9*, 193–198.

Gruenert, D.C., Finkbeiner, W.E., and Widdicombe, J.H. (1995). Culture and transformation of human airway epithelial cells. Am. J. Physiol. *268*, L347–L360.

Henderson, A.G., Ehre, C., Button, B., Abdullah, L.H., Cai, L.-H., Leigh, M.W., DeMaria, G.C., Matsui, H., Donaldson, S.H., Davis, C.W., et al. (2014). Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. J. Clin. Invest. *124*, 3047–3060.

Jeanson, L., Guerrera, I.C., Papon, J.-F., Chhuon, C., Zadigue, P., Prulière-Escabasse, V., Amselem, S., Escudier, E., Coste, A., and Edelman, A. (2014). Proteomic analysis of nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients. PloS One *9*, e108671.

Kang, J.H., Hwang, S.M., and Chung, I.Y. (2015). S100A8, S100A9 and S100A12 activate airway epithelial cells to produce MUC5AC via extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor-κB pathways. Immunology *144*, 79–90.

Kesimer, M., and Gupta, R. (2015). Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering. Methods San Diego Calif.

Levänen, B., Bhakta, N.R., Torregrosa Paredes, P., Barbeau, R., Hiltbrunner, S., Pollack, J.L., Sköld, C.M., Svartengren, M., Grunewald, J., Gabrielsson, S., et al. (2013b). Altered microRNA

profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 894–903.

MacGregor, G., Gray, R.D., Hilliard, T.N., Imrie, M., Boyd, A.C., Alton, E.W.F.W., Bush, A., Davies, J.C., Innes, J.A., Porteous, D.J., et al. (2008). Biomarkers for cystic fibrosis lung disease: application of SELDI-TOF mass spectrometry to BAL fluid. J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc. *7*, 352–358.

Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. J. Proteomics *73*, 1907–1920.

Meziani, F., Tesse, A., David, E., Martinez, M.C., Wangesteen, R., Schneider, F., and Andriantsitohaina, R. (2006). Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. Am. J. Pathol. *169*, 1473–1483.

Mostefai, H.A., Meziani, F., Mastronardi, M.L., Agouni, A., Heymes, C., Sargentini, C., Asfar, P., Martinez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2008). Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *178*, 1148–1155.

Nolte-'t Hoen, E.N.M., Buschow, S.I., Anderton, S.M., Stoorvogel, W., and Wauben, M.H.M. (2009). Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. Blood *113*, 1977–1981.

Peters-Hall, J.R., Brown, K.J., Pillai, D.K., Tomney, A., Garvin, L.M., Wu, X., and Rose, M.C. (2015). Quantitative Proteomics Reveals an Altered Cystic Fibrosis In Vitro Bronchial Epithelial Secretome. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *53*, 22–32.

Pisitkun, T., Shen, R.-F., and Knepper, M.A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 13368–13373.

Porro, C., Lepore, S., Trotta, T., Castellani, S., Ratclif, L., Battaglino, A., Di Gioia, S., Martínez, M.C., Conese, M., and Maffione, A.B. (2010). Isolation and characterization of microparticles in sputum from cystic fibrosis patients. Respir. Res. *11*, 94.

Porro, C., Di Gioia, S., Trotta, T., Lepore, S., Panaro, M.A., Battaglino, A., Ratclif, L., Castellani, S., Bufo, P., Martinez, M.C., et al. (2013). Pro-inflammatory effect of cystic fibrosis sputum microparticles in the murine lung. J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc. *12*, 721–728.

Qazi, K.R., Torregrosa Paredes, P., Dahlberg, B., Grunewald, J., Eklund, A., and Gabrielsson, S. (2010). Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. Thorax *65*, 1016–1024.

Reid, P.A., McAllister, D.A., Boyd, A.C., Innes, J.A., Porteous, D., Greening, A.P., and Gray, R.D. (2015). Measurement of serum calprotectin in stable patients predicts exacerbation and lung function decline in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *191*, 233–236.

Sly, P.D., Gangell, C.L., Chen, L., Ware, R.S., Ranganathan, S., Mott, L.S., Murray, C.P., Stick, S.M., and AREST CF Investigators (2013). Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. N. Engl. J. Med. *368*, 1963–1970.

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr. Protoc. Cell Biol. Editor. Board Juan Bonifacino Al *Chapter 3*, Unit 3.22.

Torregrosa Paredes, P., Esser, J., Admyre, C., Nord, M., Rahman, Q.K., Lukic, A., Rådmark, O., Grönneberg, R., Grunewald, J., Eklund, A., et al. (2012). Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. Allergy *67*, 911–919.

Tual-Chalot, S., Guibert, C., Muller, B., Savineau, J.-P., Andriantsitohaina, R., and Martinez, M.C. (2010). Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *182*, 261–268.

Wiśniewski, J.R., Zougman, A., and Mann, M. (2009). Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. J. Proteome Res. *8*, 5674–5678.

Zakharova, L., Svetlova, M., and Fomina, A.F. (2007). T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. J. Cell. Physiol. *212*, 174–181.

Zhou, H., Pisitkun, T., Aponte, A., Yuen, P.S.T., Hoffert, J.D., Yasuda, H., Hu, X., Chawla, L., Shen, R.-F., Knepper, M.A., et al. (2006). Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. Kidney Int. *70*, 1847–1857.

Ziady, A.G., and Hansen, J. (2014). Redox balance in cystic fibrosis. Int. J. Biochem. Cell Biol. *52*, 113–123.

Discussion et perspectives

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ma thèse a concerné l'analyse des exosomes issus de liquides biologiques par les approches protéomiques. Dans un premier temps, je me suis consacré à l'étude des exosomes présents dans l'urine, dans le cadre d'une maladie génétique : la cystinurie. La comparaison du profil protéique des patients avec des sujets sains m'a permis d'identifier 165 protéines différentiellement exprimées chez ces patients. Un des points importants de ce chapitre a été la mise en évidence d'une signature inflammatoire chez ces patients, jamais documentée jusque-là.

Un deuxième travail, réalisé également sur les exosomes urinaires, a concerné la recherche de biomarqueurs de cancer du rein. Pour cela, j'ai comparé, par spectrométrie de masse, les profils protéiques des exosomes urinaires de patients atteints de cancer du rein à cellules claires, avant et après néphrectomie. J'ai pu démasquer une surexpression de 25 protéines chez ces patients, avant néphrectomie. L'analyse du niveau d'expression de ces protéines chez les patients par rapport à des sujets sains m'a permis de montrer que trois protéines étaient particulièrement importantes dans ce panel, car elles sont indétectables chez les sujets sains et facilement identifiées avant l'intervention chirurgicale. Ces trois protéines permettent de classifier correctement six des sept patients.

Pour finir, un dernier pan de ma thèse a concerné l'analyse protéomique des exosomes isolés à partir du LBA de patients MV qui a été comparée aux LBAs de patients asthmatiques. L'analyse statistique des protéines identifiées a montré que 53 protéines sont exprimées de façon différentielle dans les exosomes de patients MV. Parmi ces protéines, quatre sont impliquée dans l'activité peroxydase, un tiers dans le transport ionique et un quart ont une activité hydrolase.

1 Les exosomes sont-ils une bonne source de biomarqueurs ?

Une des premières difficultés rencontrées au cours de ma thèse était liée au choix de la méthode pour la préparation des exosomes. Cette méthode devait être robuste et reproductible afin que les variations d'abondance de protéines détectées par MS ne soient pas dues aux

variations dans les préparations des échantillons. J'ai opté pour l'isolement des exosomes par ultracentrifugation. Bien qu'il s'agisse de la méthode la plus couramment utilisée, elle n'en demeure pas moins longue et fastidieuse à mettre au point. Dans le cas des exosomes urinaires, l'analyse est perturbée par de très grandes quantités de THP. Cette contamination peut introduire un biais dans la reproductibilité de préparation des exosomes urinaires. Les améliorations que j'ai introduites dans la méthode ont permis de limiter l'interférence induite par la THP, mais pas de l'éliminer. La question de l'influence de la THP sur les protéines extraites des échantillons mérite d'être posée. La THP a pour caractéristique de s'organiser en filaments, par formation de ponts disulfures entre ses monomères. De plus, le taux de THP varie d'un sujet à l'autre de façon considérable, il est donc possible que certaines protéines ou exosomes restent piégés par la THP. Par ailleurs, les méthodes permettant de diminuer la THP risque d'éliminer ces protéines simultanément. Une étude systématique en fonction des taux de THP dans les exosomes mérite d'être menée.

L'utilisation des exosomes de liquides biologiques pour la recherche de biomarqueurs pose un autre problème concernant la quantité initiale de matériel nécessaire pour l'analyse par MS. En effet, j'ai pu observer, dans les deux liquides biologiques que j'ai étudiés (urines et LBA), que la quantité de protéines extraite d'un même volume et provenant de deux individus différents (malades ou non) est très variable et a été observée dans d'autres études (Alvarez et al., 2012). C'est un problème important dans le cadre clinique où il faut définir le volume de liquide biologique à collecter pour faciliter le travail des médecins et infirmières d'une part, et d'autre part avoir suffisamment de matériel pour réaliser les expériences de protéomique et de validation ultérieure.

Une dernière difficulté liée à la préparation des exosomes par ultracentrifugation et de l'ordre pratique. Elle concerne l'entretien des rotors. L'utilisation très régulière d'un rotor peut amener à une usure prématurée du joint qui isole les tubes de la centrifugeuse, qui est sous vide. Si le joint cède, il y a un risque de perte de l'échantillon. Ce risque est d'autant plus grand qu'il s'agit d'échantillons uniques, tels que les prélèvements réalisés avant néphrectomie, chez les patients atteints de cancer du rein, par exemple.

L’utilisation de l’ultracentrifugation est cependant utile car elle permet le traitement de grands volumes d’échantillons de façon simultanée. Cela a été particulièrement important pour la mise au point de la technique de séparation des protéines par isoélectrofocalisation, à partir d’une même source de protéines (Bourderioux et al., 2014).

Un des intérêts de l’analyse des exosomes en comparaison aux liquides biologiques est l'enrichissement qu'ils représentent en protéines de cellules épithéliales. Cela permet d'identifier des protéines qui ne sont pas détectables dans le fluide en lui-même. Dans le cadre de la cystinurie, par exemple, il a été possible de détecter la protéine rBAT, une des deux protéines mutées impliquées dans la cystinurie.

L’analyse protéomique des exosomes urinaires de patients cystinuriques d’une part et l’analyse des exosomes du LBA de patients MV, d’autre part, ont chacune permis de mettre en évidence une signature inflammatoire chez ces patients. Si chez les patients MV il s’agit d’un phénomène connu, c’est en revanche une observation nouvelle concernant la physiopathologie de la cystinurie. Pour l’approfondir, nous avons recherché la présence de leucocytes dans les urines des patients cytinuriques. Il est en effet connu que les leucocytes urinaires sont associés à l’inflammation. Dans le cas de la cystinurie les taux de leucocytes urinaires étaient en dessous du seuil de détection, il pourrait donc s’agir d’une inflammation stérile qui participerait au processus pathologique. En revanche, il est établi que les bronches de patients MV sont infiltrées par des polynucléaires neutrophiles. Ils phagocytent les pathogènes et libèrent des médiateurs qui contribuent à la réponse inflammatoire.

Cela soulève beaucoup d’interrogations concernant l’origine des exosomes dans ces deux liquides biologiques. Si les exosomes que nous isolons sont sécrétés par les polynucléaires neutrophiles, cela biaise le concept de « biopsie liquide » que représentent les exosomes. Une expérience de validation serait de réaliser des expériences de microscopie électronique (immunogold), afin de valider si les exosomes de patients contiennent des marqueurs de neutrophiles. Cela permettrait de savoir si les exosomes isolés proviennent principalement des cellules du tractus urinaire, ou s'il y a une contamination par des exosomes sécrétés par des neutrophiles.

2 Protéomique pour la recherche de biomarqueurs

Dans ce travail, je me suis concentré sur l'analyse des exosomes par protéomique. Le grand avantage de cette méthode d'analyse des protéines est de réaliser les expériences sans a priori. Dans les méthodes dites « classiques » d'analyse d 'expression des protéines, comme l'immunohistochimie ou le Western blot, l'utilisation d'anticorps est un pré requis qui nécessite la connaissance des protéines que l'on souhaite analyser. Cet avantage de la spectrométrie de masse, un des éléments clef de l'approche protéomique, est également un de ces inconvénients. La spectrométrie de masse étant une technique permettant de réaliser un inventaire des protéines présentes dans un échantillon, de grands jeux de données sont générés par ce type d'analyse. Il est donc nécessaire d'utiliser et maitriser des outils informatiques et statistiques performants afin de pouvoir mettre en évidences des différences très fines dans les protéomes (Cox et al., 2014).

Un autre problème lié à la spectrométrie de masse est qu'il ne s'agit pas d'un recensement exhaustif des protéines d'un échantillon. Tout d'abord parce que des protéines fortement abondantes, qui représentent 90% des protéines totales, présentes dans les liquides biologiques vont monopoliser le temps d'analyse du spectromètre de masse, en plus de risquer de masquer les protéines de plus faibles abondance (Anderson, 2005). D'autre part, une autre limitation est de l'ordre technique. Une étude a montré que seules 70% des protéines étaient à nouveau fragmentées lors de deux analyses successives d'un même échantillon (Finney et al., 2008). Afin de pallier à cet inconvénient, il est nécessaire d'analyser chaque échantillon en triplicats techniques. L'augmentation du nombre d'analyse par échantillon va encore une fois augmenter les données acquises pour chaque patient augmentant non seulement la quantité des données à analyser mais aussi le coût global de l'analyse par spectrométrie de masse.

Il y a plusieurs logiciels permettant l'analyse de grands jeux de données par MS, tels que protéome Discoverer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ou MaxQuant (Max-Planck Institute for Biochemistry, Munich, Germany). Le logiciel que j'ai choisi est MaxQuant (Cox et Mann, 2008). Ce logiciel d'analyse des données de spectrométrie de masse nécessite de longs temps de traitement, surtout pour le cas de grands jeux de données. Par exemple, pour notre étude sur la

cystinurie, 12 fractions OFF-Gel provenant de 18 patients et témoins ont été analysées en spectrométrie de masse. Ces 216 fichiers ont nécessité plus de 24 heures d'analyse par ce logiciel, monopolisant un ordinateur spécialement prévu pour cela.

Un autre souci auquel j'ai été confronté pendant ma thèse concerne l'évolution technologique des spectromètres de masse. En effet, les travaux concernant la cystinurie ont été réalisés sur un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos, tandis que les échantillons de patients atteints de cancer du rein et de MV ont été analysés sur un LTQ-Orbitrap Q-exactive PLUS. Or j'ai souhaité réaliser l'analyse de courbe ROC en comparant les données de patients RCC aux données de sujets sains, acquis sur un instrument différent. Pour pouvoir comparer ces jeux de données, j'ai décidé de normaliser les données obtenues pour chaque protéine par la valeur de l'expression de la protéine Alix. Il s'agit d'une protéine qui est impliquée dans la biogenèse des exosomes, et qui est identifiée avec une grande confiance dans les exosomes urinaires.

Pour finir, et afin d'obtenir un panel avec le meilleur pouvoir diagnostic possible, il serait intéressant de compléter cette analyse grâce à la biologie des systèmes. En effet la biologie des systèmes est une approche holistique d'un problème biologique (comparé à l'approche classique réductionniste). Les avancées de la biotechnologie ont rendu possible l'acquisition de grands jeux de donnée afin de caractériser les rôles du génome, de l'épigénome, du transcriptome, du protéome et du métabolome dans des pathologies (He et al., 2012). Grâce au développement d'outils informatiques dédiés, plusieurs groupes ont commencé à intégrer les profils d'expression des gènes et des protéines avec des cartes des voies de signalisation à l'échelle des systèmes pour identifier des biomarqueurs capables de diagnostiquer la gravité de la maladie et de prévoir les conséquences de la maladie (Chuang et al., 2007). Plusieurs groupes se sont déjà intéressés à la recherche de biomarqueurs microARN dans les exosomes urinaires (Cheng et al., 2014) ou circulants (Taylor et Gercel-Taylor, 2008).

L'analyse des exosomes de liquides biologiques par protéomique et transcriptomique, pour le cancer du rein par exemple, pourrait donc permettre d'obtenir une signature de biomarqueurs plus pertinente que les protéines seules.

3 Méthodologie des études cliniques

Notre d'étude, à la frontière de la recherche fondamentale et de la recherche clinique s'inscrit dans la recherche translationnelle. Pour la mener à bien, plusieurs facteurs doivent être pris en compte.

Il est fondamental, en amont des méthodes, que la conception de l'étude soit bien préparée. La collaboration entre le médecin et le chercheur doit être exemplaire. Les deux protagonistes doivent être à l'écoute l'un de l'autre. Par exemple, le choix des patients et témoins est particulièrement important pour la suite de l'étude et doit être déterminée avant de commencer l'étude. Notamment l'âge et sexe de sujets entrant dans le protocole doivent être choisis en fonction des questions posées. Le médecin doit comprendre les impératifs des chercheurs (par ex. l'heure de prélèvement, l'envoi en moins de trois heures au laboratoire), le chercheur doit comprendre le corps médical (le patient passe avant la recherche, les problèmes liés au recrutement des patients pour l'étude, etc...). Dans le cadre de mon travail sur la cystinurie, par exemple, les patients sélectionnés avaient un âge variant entre 1 et 83. Or les premiers témoins dont nous avons collecté les urines avaient un âge situé entre 23 et 29 ans. Il a fallu organiser une deuxième collecte sur des sujets sains afin de pouvoir réaliser un appariement par âge.

Concernant les patients atteints de cancer du rein, la cohorte est composée de huit patients, dont un a une tumeur chromophobe, pour sept à cellules claires. Parmi ces derniers, six avaient des tumeurs d'une taille inférieure à 4 cm, une entre 4 et 7 cm et supérieure à 7 cm. Il s'agit d'un panel assez hétérogène de patients qui rend plus difficile l'analyse critique des résultats. Une deuxième étape est une étape de validation. Il faut maintenant confirmer les résultats que nous avons obtenus en analysant les exosomes urinaires d'un panel de patients ayant une tumeur en place d'au moins 4 cm (stade T1b ou plus). Cela permettra une sécrétion suffisamment importante d'exosomes tumoraux pour être significativement plus important par rapport à après la néphrectomie.

Le problème de sélection des témoins est d'autant plus difficile concernant les LBA des patients MV. En effet, pour des raisons éthiques, il apparaît difficile d'explorer des témoins sains,

et même d'obtenir des LBAs de patients ne présentant ni inflammation ni infection bronchique. En effet, le lavage broncho-alvéolaire est un examen invasif, dont les indications sont limitées (recherche d'un obstacle sur les voies aériennes, exploration d'une pneumopathie interstitielle chronique, recherche d'un agent infectieux), et concernent dans la grande majorité des cas des patients présentant une inflammation ou une infection bronchique. Dans cette étude, j'ai comparé les profils protéiques de patients MV infectés, aux profils de patients asthmatiques, infectés ou non. De fait, j'ai comparé deux maladies inflammatoires chroniques des voies aériennes, l'une d'origine génétique (mutation du gène CFTR dans la MV) et classiquement plus sévère, l'autre d'origine immunoallergique.

D'autre part, certains patients de notre étude étaient atteints de dyskinésie ciliaire primitive, maladie génétique rare caractérisée par une atteinte respiratoire liée à une anomalie constitutionnelle des cils, souvent associée à une atteinte extrarespiratoire (Popatia, Haver, et Casey, 2014). Dans un premier temps, nous avons écarté la possibilité d'inclure ces patients dans ces analyses du fait de leur proximité phénotypique avec les patients MV (anomalie de la clairance mucociliaire). Cependant, l'analyse comparative protéomique de ces deux maladies d'origine génétique pourrait permettre de différencier les anomalies liées à l'une ou l'autre des deux mutations, et pourrait, dans cette perspective, contribuer à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la MV.

Les conditions de recueil sont également à prendre en compte lors d'une étude translationnelle. Pour les études sur les urines, sur la base de publications précédentes et d'expériences préliminaires, j'ai opté pour la collecte des premières urines du matin, immédiatement mélangées avec un cocktail d'antiprotéases et congelées à -80°C dans une fenêtre de trois heures. Le recueil des premières urines du matin a été choisi car dans ces urines sont accumulées les protéines de la nuit. Ces échantillons sont donc plus riches en matériel. L'ajout d'antiprotéase a également été testé par notre équipe et s'est révélé nécessaire pour éviter une diminution drastique du rendement de l'isolement des exosomes.

Cependant, le fait de devoir ajouter des antiprotéases et collecter les premières urines du matin rajoute une difficulté à la collecte d'échantillons. Cela sous-entend que les patients aient

chez eux, la veille du prélèvement, le conteneur de recueil avec les antiprotéases. Ceci suppose donc que les patients soient passés la veille à l'hôpital afin de récupérer le conteneur, et par conséquent une organisation supplémentaire.

En ce qui concerne l'analyse des données de la MS, per se, la méthode de normalisation est essentielle afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre différents patients et témoins. Dans les trois études auxquelles j'ai participé, la normalisation a été réalisée en analysant la même quantité de protéine par spectrométrie de masse. Dans le cadre d'analyse protéomique des urines, ce type de normalisation pourrait être biaisé à cause d'une protéinurie, qui fausserait les dosages protéiques réalisés. Grâce à l'analyse des exosomes urinaires, il est possible de contourner cette limite. Il y a cependant un résidu de « contamination » par des protéines fortement abondantes, comme la THP dans les urines.

Une autre méthode de normalisation consisterait à utiliser la créatinine urinaire, en assumant que celle-ci ne varie pas chez un individu au cours du temps. Cette méthode permettrait de calibrer les volumes d'analytes (Chen et al., 2013). Mais cette approche a été critiquée dans des cas pathologiques avec modification du débit de filtration glomérulaire, et pourrait résulter en une sur- ou sous-estimation du débit d'un biomarqueur (Waikar, Sabbisetti, et Bonventre, 2010).

Concernant la variabilité du protéome des exosomes urinaires, une question qui reste à tester est le régime alimentaire du donneur. Des études ont montré l'effet du régime alimentaire sur le protéome urinaire (Mullen et al., 2011), mais aucun travail n'a été mené sur les exosomes urinaires. Il serait intéressant de tester si l'hydratation, ou un régime alimentaire contrôlé pendant une période donnée influence l'expression des protéines urinaires et exosomales.

Finalement nous avons effectué une étude pour comparer si le mélange des échantillons de plusieurs individus change le profil protéique par rapport aux profils individuels. Auparavant, plusieurs études ont été réalisées sur des mélanges d'urines de patients contre ceux de témoins. En effet, des sept études ayant recherché des biomarqueurs de maladies dans les exosomes urinaires, cinq ont été réalisées sur des mélanges d'urines d'individus (Tableau 6, paragraphe 3.3.2 de l'Introduction). Cette technique permet de diminuer les variations entre individus, à

condition que la bonne méthode de normalisation ait été sélectionnée, mais va également être moins pertinente pour la recherche de marqueurs finement dérégulés. J'ai, dans mon travail, réalisé la comparaison des urines de quatre sujets sains individuellement, et comparé les résultats à ceux obtenus avec un mélange d'urine (v/v) de ces quatre patients. La comparaison des profils protéiques individuels et de leur pool m'a permis de constater que le mélange d'urine n'était pas représentatif de ces quatre témoins de manière équivalente. En effet, le mélange des urines de ces individus était plus représentatif d'un de ces individus ayant une forte concentration en exosomes. Ce résultat suggère qu'il est plus pertinent d'analyser les exosomes individuellement pour des études comparant les profils protéiques.

4 Perspectives

Parmi les développements technologiques qui doivent être conduits à la suite des travaux présentés ici, la mise en place de dosage PRM (décrit paragraphe 2.2.2.3 de l'Introduction). C'est une technologie de dosage des protéines (peptides) par spectrométrie de masse. Cette approche pourrait ensuite être introduite en routine, dans les services de biochimie des hôpitaux. Elle présente l'avantage par rapport aux méthodes classique de dosage de ne pas nécessiter d'anticorps, et d'être peu coûteuse en consommable après mise au point.

4.1 Cystinurie

A la suite de l'étude de la cystinurie, des expériences préliminaires de dosage par PRM des 38 protéines surexprimées chez les patients ont été débutées. Lors de ces expériences, les peptides de 26 protéines se sont révélées compatibles pour l'analyse PRM et ont donné un signal linéaire (Annexe, Figure 17). L'objectif de notre équipe est de confirmer par quantification absolue par MS que ces 26 protéines sont surexprimées chez les patients. Nous souhaiterions, par la suite, valider que ces protéines permettent également de stratifier les patients. Pour cela nous sommes en train de collecter des urines d'un panel de patients plus important, à divers stade d'avancement d'atteinte rénale et appariés pour l'âge et le sexe, en collaboration avec le service de néphrologie pédiatrique de Necker (Pr. Knebelmann). Notre hypothèse est que les protéines

de notre panel auront une expression augmentée au fur et à mesure de l'avancement de l'atteinte rénale.

D'autre part, nous souhaiterions tester notre panel de biomarqueurs sur d'autres cristalluries, non nécessairement d'origine génétique. Pour cela, nous sommes en collaboration avec le service d'exploration rénale de l'HEGP (Dr. Courbebaisse). Notre objectif est ici de vérifier si notre panel de protéines est spécifique des patients cystinuriques, ou s'il s'agit d'un mécanisme plus général, liée à la cristallurie et à la récurrence des calculs rénaux. Nous souhaitons également élargir notre champ de recherche aux patients atteints de glomérulonéphrite rapidement progressive (GNRP). La présence d'auto-anticorps anti-myéloperoxidase est en effet typique des GNRP de type 3, dues à des lésions inflammatoires des artérioles glomérulaires (Halfon et al., 2014). Par ailleurs, la présence de MPO dans les glomérules de ces patients a été observée (Saeki et al., 1995). Notre objectif serait alors de surveiller le niveau de concentration en MPO dans les exosomes urinaires, et s'il pourrait y avoir une corrélation avec le pronostic, qui est de 68% à un an chez les patients d'emblée dépendants de la dialyse (Hedger et al., 2000).

4.2 Cancers à cellules claires

Pour la suite de l'étude sur le cancer du rein, nous sommes actuellement en train de collecter les urines de nouveaux patients. Nous souhaitons isoler les exosomes et confirmer, par Western blot, que les trois protéines d'intérêt sont surexprimées chez les patients avant intervention chirurgicale et non détectées chez des témoins appariés pour l'âge et le sexe. Un futur objectif serait de développer le dosage par PRM de notre panel. Nous envisagerions, à terme, de faire développer un test ELISA afin de détecter ces protéines directement dans les urines pour simplifier son transfert en clinique.

De manière globale, pour les études sur les exosomes urinaires, nous voudrions développer les techniques de préparation des exosomes urinaires par filtration, de manière à simplifier la procédure.

4.3 La mucoviscidose

La suite de notre étude sur les exosomes respiratoires sera plus fondamentale. D'une part nous souhaiterions confirmer que les exosomes de patients ayant une mutation dans le CFTR sont plus petits, en moyenne, que les exosomes issus de patients avec un CFTR sauvage. Ceci pourrait être un indice allant dans le sens d'un défaut dans l'endocytose dû à des mutations dans CFTR, comme cela a été montré dans le rein (Jouret et Devuyst, 2009). Pour cela, nous voulons comparer en microscopie électronique les exosomes issus du surnageant de cellules CFBE exprimant un CFTR sauvage à ceux issus du surnageant de cellules CFBE exprimant F508del CFTR. Concernant le panel de 53 protéines différentiellement exprimées, une possibilité serait d'analyser, suivant le même protocole, des patients atteints d'autres pathologies pulmonaires pour établir s'il s'agit d'une signature spécifique des patients MV. Finalement, l'analyse des exosomes respiratoires de patients présentant une dyskinésie ciliaire pourrait permettre de valider s'il s'agit d'une signature spécifique à des patients présentant une mutation sur CFTR.

Finalement, d'un point de vue fondamental, nous voudrions tester si les exosomes respiratoires ou issus de cellules cultivées en interface air-liquide peuvent se réintégrer au sein de cellules en culture exprimant une protéine F508del CFTR. L'objectif est ici de vérifier s'il est possible de transférer une protéine CFTR sauvage, ou encore des ARNm codant pour une protéine CFTR sauvage dans les cellules exprimant une mutation de CFTR, comme démontré via des microparticules (Gonzalez et al., 2012). Nous réaliserons, d'une part, des tests fonctionnels pour tester si les cellules CFBE F508del CFTR ont une restauration de la fonction canal chlorure, ainsi que des tests ELISA (IL-8, IL-6, TNF-α) pour valider la normalisation du profil inflammatoire dans ces cellules. Si, ces tests sont positifs, on pourrait alors envisager l'utilisation des exosomes comme approche thérapeutique. Notons que ce type d'approche a fait l'objet d'un financement par l'agence nationale de la recherche en 2008 (http://www.agence-nationale-recherche.fr/?Projet=ANR-08-EBIO-0010), et qu'une « start-up » a depuis été créée, Ciloa (http://ciloa.fr/, Montpellier, France), qui offre comme service de modifier des exosomes afin qu'ils transfèrent une protéine spécifique et fonctionnelle à une cellule cible.

Bibliographie

Adachi J., Kumar C., Zhang Y., Olsen J. V., Mann M. « The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins ». *Genome Biol.* [En ligne]. 2006. Vol. 7, n°9, p. R80. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-R80 >

Adkins J. N., Varnum S. M., Auberry K. J., Moore R. J., Angell N. H., Smith R. D., Springer D. L., Pounds J. G. « Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry ». *Mol. Cell. Proteomics MCP*. décembre 2002. Vol. 1, n°12, p. 947‑955.

Admyre C., Grunewald J., Thyberg J., Gripenbäck S., Tornling G., Eklund A., Scheynius A., Gabrielsson S. « Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid ». *Eur. Respir. J.* octobre 2003. Vol. 22, n°4, p. 578‑583.

Admyre C., Johansson S. M., Paulie S., Gabrielsson S. « Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT ». *Eur. J. Immunol.* [En ligne]. juillet 2006. Vol. 36, n°7, p. 1772‑1781. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/eji.200535615 >

Admyre C., Johansson S. M., Qazi K. R., Filén J.-J., Lahesmaa R., Norman M., Neve E. P. A., Scheynius A., Gabrielsson S. « Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 1 août 2007. Vol. 179, n°3, p. 1969‑1978.

Ahmad S., Sundaramoorthy E., Arora R., Sen S., Karthikeyan G., Sengupta S. « Progressive degradation of serum samples limits proteomic biomarker discovery ». *Anal. Biochem.* [En ligne]. 15 novembre 2009. Vol. 394, n°2, p. 237‑242. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.07.029 >

Albrethsen J. « Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry ». *Clin. Chem.* [En ligne]. mai 2007. Vol. 53, n°5, p. 852‑858. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2006.082644 >

Alegre E., Sanmamed M. F., Rodriguez C., Carranza O., Martín-Algarra S., González A. « Study of circulating microRNA-125b levels in serum exosomes in advanced melanoma ». *Arch. Pathol. Lab. Med.* [En ligne]. juin 2014. Vol. 138, n°6, p. 828‑832. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2013-0134-OA >

Almufti R., Wilbaux M., Oza A., Henin E., Freyer G., Tod M., Colomban O., You B. « A critical review of the analytical approaches for circulating tumor biomarker kinetics during treatment ». *Ann. Oncol.* [En ligne]. 1 janvier 2014. Vol. 25, n°1, p. 41‑56. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdt382 >

Alvarez M. L., Khosroheidari M., Kanchi Ravi R., DiStefano J. K. « Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers ». *Kidney Int.* novembre 2012. Vol. 82, n°9, p. 1024‑1032.

Andersen J. S., Wilkinson C. J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E. A., Mann M. « Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling ». *Nature* [En ligne]. 4 décembre 2003. Vol. 426, n°6966, p. 570‑574. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nature02166 >

Anderson L. « Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease ». *J. Physiol.* [En ligne]. 15 février 2005. Vol. 563, n°Pt 1, p. 23‑60. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2004.080473 >

Anderson L., Hunter C. L. « Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. avril 2006. Vol. 5, n°4, p. 573‑588. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M500331-MCP200 >

Anderson N. L. « The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum ». *Clin. Chem.* [En ligne]. février 2010. Vol. 56, n°2, p. 177‑185. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2009.126706 >

Anderson N. L., Anderson N. G. « The Human Plasma Proteome History, Character, and Diagnostic Prospects ». *Mol. Cell. Proteomics* [En ligne]. 11 janvier 2002. Vol. 1, n°11, p. 845‑867. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.R200007-MCP200 >

Andreola G., Rivoltini L., Castelli C., Huber V., Perego P., Deho P., Squarcina P., Accornero P., Lozupone F., Lugini L., Stringaro A., Molinari A., Arancia G., Gentile M., Parmiani G., Fais S. « Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles ». *J. Exp. Med.* 20 mai 2002. Vol. 195, n°10, p. 1303‑1316.

Aoki J., Ohashi K., Mitsuhashi M., Murakami T., Oakes M., Kobayashi T., Doki N., Kakihana K., Sakamaki H. « Posttransplantation bone marrow assessment by quantifying hematopoietic cell-derived mRNAs in plasma exosomes/microvesicles ». *Clin. Chem.* [En ligne]. avril 2014. Vol. 60, n°4, p. 675‑682. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2013.213850 >

Armbruster D. A., Pry T. « Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation ». *Clin. Biochem. Rev.* août 2008. Vol. 29, n°Suppl 1, p. S49‑S52.

Asea A., Jean-Pierre C., Kaur P., Rao P., Linhares I. M., Skupski D., Witkin S. S. « Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids ». *J. Reprod. Immunol.* [En ligne]. octobre 2008. Vol. 79, n°1, p. 12‑17. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2008.06.001 >

Assimos D. G., Leslie S. W., Ng C., Streem S. B., Hart L. J. « The impact of cystinuria on renal function ». *J. Urol.* juillet 2002. Vol. 168, n°1, p. 27‑30.

Babst M., Katzmann D. J., Estepa-Sabal E. J., Meerloo T., Emr S. D. « Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting ». *Dev. Cell*. août 2002. Vol. 3, n°2, p. 271‑282.

Baccini A., Besse P., Déjean S., MArtin P. G. P., Robert-Granié C., San Cristobal M. « Stratégies pour l'analyse statistique de données transcriptomiques ». *J. Société Fr. Stat.* 2005. Vol. 146, n°1-2,.

Bache K. G., Brech A., Mehlum A., Stenmark H. « Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes ». *J. Cell Biol.* [En ligne]. 4 août 2003. Vol. 162, n°3, p. 435‑442. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200302131 >

Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. « Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review ». *Anal. Bioanal. Chem.* [En ligne]. octobre 2007. Vol. 389, n°4, p. 1017‑1031. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6 >

Bastos-Amador P., Royo F., Gonzalez E., Conde-Vancells J., Palomo-Diez L., Borras F. E., Falcon-Perez J. M. « Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability ». *J. Proteomics* [En ligne]. 27 juin 2012. Vol. 75, n°12, p. 3574‑3584. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.054 >

Bauça J. M., Martínez-Morillo E., Diamandis E. P. « Peptidomics of urine and other biofluids for cancer diagnostics ». *Clin. Chem.* [En ligne]. août 2014. Vol. 60, n°8, p. 1052‑1061. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2013.211714 >

Beach A., Zhang H.-G., Ratajczak M. Z., Kakar S. S. « Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer ». *J. Ovarian Res.* [En ligne]. 25 janvier 2014. Vol. 7, n°1, p. 14. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1186/1757-2215-7-14 >

Becker L., Kheirandish-Gozal L., Peris E., Schoenfelt K. Q., Gozal D. « Contextualized Urinary Biomarker Analysis Facilitates Diagnosis Of Pediatric Obstructive Sleep Apnea ». *Sleep Med.* [En ligne]. mai 2014. Vol. 15, n°5, p. 541‑549. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.sleep.2014.01.010 >

Bell D. Y., Haseman J. A., Spock A., McLennan G., Hook G. E. « Plasma proteins of the bronchoalveolar surface of the lungs of smokers and nonsmokers ». *Am. Rev. Respir. Dis.* juillet 1981. Vol. 124, n°1, p. 72‑79.

Bondarenko P. V., Chelius D., Shaler T. A. « Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid

chromatography-tandem mass spectrometry ». *Anal. Chem.* 15 septembre 2002. Vol. 74, n°18, p. 4741‑4749.

Bosso N., Chinello C., Picozzi S. C. M., Gianazza E., Mainini V., Galbusera C., Raimondo F., Perego R., Casellato S., Rocco F., Ferrero S., Bosari S., Mocarelli P., Kienle M. G., Magni F. « Human urine biomarkers of renal cell carcinoma evaluated by ClinProt ». *Proteomics Clin. Appl.* [En ligne]. juillet 2008. Vol. 2, n°7-8, p. 1036‑1046. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/prca.200780139 >

Botzenhart E., Vester U., Schmidt C., Hesse A., Halber M., Wagner C., Lang F., Hoyer P., Zerres K., Eggermann T. « Cystinuria in children: Distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes ». *Kidney Int.* [En ligne]. octobre 2002. Vol. 62, n°4, p. 1136‑1142. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2002.kid552.x >

Bourderioux M., Nguyen-Khoa T., Chhuon C., Jeanson L., Tondelier D., Walczak M., Ollero M., Bekri S., Knebelmann B., Escudier E., Escudier B., Edelman A., Guerrera I. C. « A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. 3 novembre 2014. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr501003q >

Bowler R. P., Duda B., Chan E. D., Enghild J. J., Ware L. B., Matthay M. A., Duncan M. W. « Proteomic analysis of pulmonary edema fluid and plasma in patients with acute lung injury ». *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* [En ligne]. juin 2004. Vol. 286, n°6, p. L1095‑1104. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00304.2003 >

Buhimschi I. A., Zhao G., Funai E. F., Harris N., Sasson I. E., Bernstein I. M., Saade G. R., Buhimschi C. S. « PROTEOMIC PROFILING OF URINE IDENTIFIES SPECIFIC FRAGMENTS OF SERPINA-1 AND ALBUMIN AS BIOMARKERS OF PREECLAMPSIA ». *Am. J. Obstet. Gynecol.* [En ligne]. novembre 2008. Vol. 199, n°5, p. 551.e1‑551.16. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2008.07.006 >

Caby M.-P., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C., Raposo G., Bonnerot C. « Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma ». *Int. Immunol.* [En ligne]. juillet 2005. Vol. 17, n°7, p. 879‑887. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxh267 >

Campbell S. C., Novick A. C., Belldegrun A., Blute M. L., Chow G. K., Derweesh I. H., Faraday M. M., Kaouk J. H., Leveillee R. J., Matin S. F., Russo P., Uzzo R. G., Practice Guidelines Committee of the American Urological Association. « Guideline for management of the clinical T1 renal mass ». *J. Urol.* [En ligne]. octobre 2009. Vol. 182, n°4, p. 1271‑1279. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2009.07.004 >

Carbonnelle E., Mesquita C., Bille E., Day N., Dauphin B., Beretti J.-L., Ferroni A., Gutmann L., Nassif X. « MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory ». *Clin. Biochem.* [En ligne]. janvier 2011. Vol. 44, n°1, p. 104‑109. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017 >

Cazzoli R., Buttitta F., Di Nicola M., Malatesta S., Marchetti A., Pass H. I. « MicroRNAs derived from circulating exosomes as non-invasive biomarkers for screening and diagnose lung cancer ». *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* [En ligne]. septembre 2013. Vol. 8, n°9, p. 1156‑1162. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e318299ac32 >

Chan K. C., Lucas D. A., Hise D., Schaefer C. F., Xiao Z., Janini G. M., Buetow K. H., Issaq H. J., Veenstra T. D., Conrads T. P. « Analysis of the human serum proteome ». *Clin. Proteomics* [En ligne]. 1 juin 2004. Vol. 1, n°2, p. 101‑225. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1385/CP:1:2:101 >

Charro N., Hood B. L., Faria D., Pacheco P., Azevedo P., Lopes C., De Almeida A. B., Couto F. M., Conrads T. P., Penque D. « Serum proteomics signature of cystic fibrosis patients: a complementary 2-DE and LC-MS/MS approach ». *J. Proteomics* [En ligne]. 1 janvier 2011. Vol. 74, n°1, p. 110‑126. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.10.001 >

Chelius D., Bondarenko P. V. « Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry ». *J. Proteome Res.* août 2002. Vol. 1, n°4, p. 317‑323.

Chen C.-L., Lai Y.-F., Tang P., Chien K.-Y., Yu J.-S., Tsai C.-H., Chen H.-W., Wu C.-C., Chung T., Hsu C.-W., Chen C.-D., Chang Y.-S., Chang P.-L., Chen Y.-T. « Comparative and Targeted Proteomic Analyses of Urinary Microparticles from Bladder Cancer and Hernia Patients ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. 19 octobre 2012. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr3008732 >

Cheng A.-J., Chen L.-C., Chien K.-Y., Chen Y.-J., Chang J. T.-C., Wang H.-M., Liao C.-T., Chen I.-H. « Oral cancer plasma tumor marker identified with bead-based affinity-fractionated proteomic technology ». *Clin. Chem.* [En ligne]. décembre 2005. Vol. 51, n°12, p. 2236‑2244. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.052324 >

Chen J., Ryu S., Gharib S. A., Goodlett D. R., Schnapp L. M. « Exploration of the normal human bronchoalveolar lavage fluid proteome ». *Proteomics Clin. Appl.* [En ligne]. avril 2008. Vol. 2, n°4, p. 585‑595. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/prca.200780006 >

Chen Y.-T., Chen C.-L., Chen H.-W., Chung T., Wu C.-C., Chen C.-D., Hsu C.-W., Chen M.-C., Tsui K.-H., Chang P.-L., Chang Y.-S., Yu J.-S. « Discovery of novel bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics using iTRAQ technology ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. 5 novembre 2010. Vol. 9, n°11, p. 5803‑5815. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr100576x >

Chen Y., Zheng S., Yu J., Hu X. « Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population ». *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* [En ligne]. 15 décembre 2004. Vol. 10, n°24, p. 8380‑8385. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1162-03 >

Cheruvanky A., Zhou H., Pisitkun T., Kopp J. B., Knepper M. A., Yuen P. S. T., Star R. A. « Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration

concentrator ». *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* [En ligne]. mai 2007. Vol. 292, n°5, p. F1657‑1661. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00434.2006 >

Chinello C., Cazzaniga M., De Sio G., Smith A. J., Gianazza E., Grasso A., Rocco F., Signorini S., Grasso M., Bosari S., Zoppis I., Dakna M., Van der Burgt Y. E. M., Mauri G., Magni F. « Urinary signatures of Renal Cell Carcinoma investigated by peptidomic approaches ». *PloS One* [En ligne]. 2014. Vol. 9, n°9, p. e106684. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106684 >

Choi D.-S., Park J. O., Jang S. C., Yoon Y. J., Jung J. W., Choi D.-Y., Kim J.-W., Kang J. S., Park J., Hwang D., Lee K.-H., Park S.-H., Kim Y.-K., Desiderio D. M., Kim K. P., Gho Y. S. « Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites ». *Proteomics* [En ligne]. juillet 2011. Vol. 11, n°13, p. 2745‑2751. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201100022 >

Chow W. H., Devesa S. S., Warren J. L., Fraumeni J. F. « Rising incidence of renal cell cancer in the United States ». *JAMA*. 5 mai 1999. Vol. 281, n°17, p. 1628‑1631.

Christensen E. I., Birn H. « Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule ». *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* avril 2001. Vol. 280, n°4, p. F562‑573.

Clayton A., Mitchell J. P., Court J., Linnane S., Mason M. D., Tabi Z. « Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 1 juin 2008. Vol. 180, n°11, p. 7249‑7258.

Cohen S. L., Chait B. T. « Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins ». *Anal. Chem.* [En ligne]. 1 janvier 1996. Vol. 68, n°1, p. 31‑37. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/ac9507956 >

Colombo M., Raposo G., Théry C. « Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles ». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* [En ligne]. 11 octobre 2014. Vol. 30, p. 255‑289. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326 >

Conti S. L., Thomas I.-C., Hagedorn J. C., Chung B. I., Chertow G. M., Wagner T. H., Brooks J. D., Srinivas S., Leppert J. T. « Utilization of cytoreductive nephrectomy and patient survival in the targeted therapy era ». *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* [En ligne]. 1 mai 2014. Vol. 134, n°9, p. 2245‑2252. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28553 >

Cox J., Hein M. Y., Luber C. A., Paron I., Nagaraj N., Mann M. « MaxLFQ allows accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction ». *Mol. Cell. Proteomics* [En ligne]. 17 juin 2014. p. mcp.M113.031591. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M113.031591 >

Cox J., Mann M. « MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification ». *Nat. Biotechnol.* [En ligne]. décembre 2008. Vol. 26, n°12, p. 1367‑1372. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1511 >

Czystowska M., Han J., Szczepanski M., Szajnik M., Quadrini K., Brandwein H., Hadden J., Signorelli K., Whiteside T. « IRX-2, a novel immunotherapeutic, protects human T cells from tumor-induced cell death ». *Cell Death Differ.* [En ligne]. mai 2009. Vol. 16, n°5, p. 708‑718. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.197 >

Datta A., Chen C. P., Sze S. K. « Discovery of Prognostic Biomarker Candidates of Lacunar Infarction by Quantitative Proteomics of Microvesicles Enriched Plasma ». *PLoS ONE* [En ligne]. 21 avril 2014. Vol. 9, n°4, p. e94663. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094663 >

Davezac N., Tondelier D., Lipecka J., Fanen P., Demaugre F., Debski J., Dadlez M., Schrattenholz A., Cahill M. A., Edelman A. « Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane ». *Proteomics* [En ligne]. décembre 2004. Vol. 4, n°12, p. 3833‑3844. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200400850 >

Dear J. W., Street J. M., Bailey M. A. « Urinary exosomes: A reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intra-renal signaling ». *Proteomics* [En ligne]. 6 novembre 2012. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200285 >

Doherty N. S., Littman B. H., Reilly K., Swindell A. C., Buss J. M., Anderson N. L. « Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis ». *Electrophoresis* [En ligne]. février 1998. Vol. 19, n°2, p. 355‑363. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150190234 >

Döring G. « Mechanisms of airway inflammation in cystic fibrosis ». *Pediatr. Allergy Immunol.* [En ligne]. 1 décembre 1996. Vol. 7, n°S9, p. 63‑66. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3038.1996.tb00398.x >

Dudley E. « MALDI profiling and applications in medicine ». *Adv. Exp. Med. Biol.* [En ligne]. 2014. Vol. 806, p. 33‑58. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-06068-2_2 >

Ebert M. P. A., Meuer J., Wiemer J. C., Schulz H.-U., Reymond M. A., Traugott U., Malfertheiner P., Röcken C. « Identification of gastric cancer patients by serum protein profiling ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. décembre 2004. Vol. 3, n°6, p. 1261‑1266. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr049865s >

Eggermann T., Venghaus A., Zerres K. « Cystinuria: an inborn cause of urolithiasis ». *Orphanet J. Rare Dis.* [En ligne]. 5 avril 2012. Vol. 7, n°1, p. 19. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-7-19 >

Eng J. K., McCormack A. L., Yates III J. R. « An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database ». *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* [En ligne]. novembre 1994. Vol. 5, n°11, p. 976‑989. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/1044-0305(94)80016-2 >

Escudier B., Porta C., Schmidinger M., Algaba F., Patard J. J., Khoo V., Eisen T., Horwich A. « Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-

up† ». *Ann. Oncol.* [En ligne]. 9 janvier 2014. Vol. 25, n°suppl 3, p. iii49‑iii56. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdu259 >

Farrah T., Deutsch E. W., Omenn G. S., Campbell D. S., Sun Z., Bletz J. A., Mallick P., Katz J. E., Malmström J., Ossola R., Watts J. D., Lin B., Zhang H., Moritz R. L., Aebersold R. « A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. septembre 2011. Vol. 10, n°9, p. M110.006353. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M110.006353 >

Fauré J., Lachenal G., Court M., Hirrlinger J., Chatellard-Causse C., Blot B., Grange J., Schoehn G., Goldberg Y., Boyer V., Kirchhoff F., Raposo G., Garin J., Sadoul R. « Exosomes are released by cultured cortical neurones ». *Mol. Cell. Neurosci.* [En ligne]. avril 2006. Vol. 31, n°4, p. 642‑648. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2005.12.003 >

Fernández-Llama P., Khositseth S., Gonzales P. A., Star R. A., Pisitkun T., Knepper M. A. « Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation ». *Kidney Int.* [En ligne]. avril 2010. Vol. 77, n°8, p. 736‑742. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/ki.2009.550 >

Fevrier B., Vilette D., Archer F., Loew D., Faigle W., Vidal M., Laude H., Raposo G. « Cells release prions in association with exosomes ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 29 juin 2004. Vol. 101, n°26, p. 9683‑9688. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308413101 >

Finney G. L., Blackler A. R., Hoopmann M. R., Canterbury J. D., Wu C. C., MacCoss M. J. « Label-free comparative analysis of proteomics mixtures using chromatographic alignment of high-resolution muLC-MS data ». *Anal. Chem.* [En ligne]. 15 février 2008. Vol. 80, n°4, p. 961‑971. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/ac701649e >

Fliser D., Novak J., Thongboonkerd V., Argilés A., Jankowski V., Girolami M. A., Jankowski J., Mischak H. « Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery ». *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* [En ligne]. avril 2007. Vol. 18, n°4, p. 1057‑1071. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2006090956 >

Fortin T., Salvador A., Charrier J. P., Lenz C., Lacoux X., Morla A., Choquet-Kastylevsky G., Lemoine J. « Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) coupling and correlation with ELISA tests ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. mai 2009. Vol. 8, n°5, p. 1006‑1015. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M800238-MCP200 >

Frantzi M., Metzger J., Banks R. E., Husi H., Klein J., Dakna M., Mullen W., Cartledge J. J., Schanstra J. P., Brand K., Kuczyk M. A., Mischak H., Vlahou A., Theodorescu D., Merseburger A. S. « Discovery and validation of urinary biomarkers for detection of renal cell carcinoma ». *J. Proteomics* [En ligne]. 25 décembre 2013. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.12.010 >

Gallien S., Duriez E., Crone C., Kellmann M., Moehring T., Domon B. « Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. décembre 2012. Vol. 11, n°12, p. 1709‑1723. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.O112.019802 >

Gasser O., Hess C., Miot S., Deon C., Sanchez J.-C., Schifferli J. A. « Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils ». *Exp. Cell Res.* 1 mai 2003. Vol. 285, n°2, p. 243‑257.

Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P. « Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 10 juin 2003. Vol. 100, n°12, p. 6940‑6945. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0832254100 >

Gharib S. A., Vaisar T., Aitken M. L., Park D. R., Heinecke J. W., Fu X. « Mapping the Lung Proteome in Cystic Fibrosis ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. 5 juin 2009. Vol. 8, n°6, p. 3020‑3028. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr900093j >

Gianazza E., Chinello C., Mainini V., Cazzaniga M., Squeo V., Albo G., Signorini S., Di Pierro S. S., Ferrero S., Nicolardi S., Van der Burgt Y. E. M., Deelder A. M., Magni F. « Alterations of the serum peptidome in renal cell carcinoma discriminating benign and malignant kidney tumors ». *J. Proteomics* [En ligne]. 5 décembre 2012. Vol. 76 Spec No., p. 125‑140. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.07.032 >

Gillet L. C., Navarro P., Tate S., Röst H., Selevsek N., Reiter L., Bonner R., Aebersold R. « Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. juin 2012. Vol. 11, n°6,. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.O111.016717 > (consulté le 19 mai 2015)

Gomes-Alves P., Penque D. « Proteomics uncovering possible key players in F508del-CFTR processing and trafficking ». *Expert Rev. Proteomics* [En ligne]. août 2010. Vol. 7, n°4, p. 487‑494. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1586/epr.10.37 >

Gonzales P. A., Pisitkun T., Hoffert J. D., Tchapyjnikov D., Star R. A., Kleta R., Wang N. S., Knepper M. A. « Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes ». *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* [En ligne]. février 2009. Vol. 20, n°2, p. 363‑379. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2008040406 >

Gonzalez-Begne M., Lu B., Han X., Hagen F. K., Hand A. R., Melvin J. E., Yates J. R. « Proteomic Analysis of Human Parotid Gland Exosomes by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. 6 mars 2009. Vol. 8, n°3, p. 1304‑1314. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr800658c >

Good D. M., Thongboonkerd V., Novak J., Bascands J.-L., Schanstra J. P., Coon J. J., Dominiczak A., Mischak H. « Body Fluid Proteomics for Biomarker Discovery: Lessons from the Past Hold the Key to Success in the Future ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. 1 décembre 2007. Vol. 6, n°12, p. 4549‑4555. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr070529w >

Good D. M., Zürbig P., Argilés A., Bauer H. W., Behrens G., Coon J. J., Dakna M., Decramer S., Delles C., Dominiczak A. F., Ehrich J. H. H., Eitner F., Fliser D., Frommberger M., Ganser A., Girolami M. A., Golovko I., Gwinner W., Haubitz M., Herget-Rosenthal S., Jankowski J., Jahn H., Jerums G., Julian B. A., Kellmann M., Kliem V., Kolch W., Krolewski A. S., Luppi M., Massy Z., Melter M., Neusüss C., Novak J., Peter K., Rossing K., Rupprecht H., Schanstra J. P., Schiffer E., Stolzenburg J.-U., Tarnow L., Theodorescu D., Thongboonkerd V., Vanholder R., Weissinger E. M., Mischak H., Schmitt-Kopplin P. « Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. novembre 2010. Vol. 9, n°11, p. 2424‑2437. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M110.001917 >

Gross J. C., Chaudhary V., Bartscherer K., Boutros M. « Active Wnt proteins are secreted on exosomes ». *Nat. Cell Biol.* [En ligne]. octobre 2012. Vol. 14, n°10, p. 1036‑1045. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/ncb2574 >

Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R. « Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags ». *Nat. Biotechnol.* [En ligne]. octobre 1999. Vol. 17, n°10, p. 994‑999. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/13690 >

Hakulinen J., Junnikkala S., Sorsa T., Meri S. « Complement inhibitor membrane cofactor protein (MCP; CD46) is constitutively shed from cancer cell membranes in vesicles and converted by a metalloproteinase to a functionally active soluble form ». *Eur. J. Immunol.* [En ligne]. septembre 2004. Vol. 34, n°9, p. 2620‑2629. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/eji.200424969 >

Hanson P. I., Cashikar A. « Multivesicular Body Morphogenesis ». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* [En ligne]. 2012. Vol. 28, n°1, p. 337‑362. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152 >

Harding C., Stahl P. « Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15 juin 1983. Vol. 113, n°2, p. 650‑658.

Hawari F. I., Rouhani F. N., Cui X., Yu Z.-X., Buckley C., Kaler M., Levine S. J. « Release of Full-Length 55-kDa TNF Receptor 1 in Exosome-Like Vesicles: A Mechanism for Generation of Soluble Cytokine Receptors ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 2 mars 2004. Vol. 101, n°5, p. 1297‑1302. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307981100 >

Heijnen H. F., Schiel A. E., Fijnheer R., Geuze H. J., Sixma J. J. « Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules ». *Blood*. 1 décembre 1999. Vol. 94, n°11, p. 3791‑3799.

He M., Crow J., Roth M., Zeng Y., Godwin A. K. « Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology ». *Lab. Chip* [En ligne]. 7 octobre 2014. Vol. 14, n°19, p. 3773‑3780. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1039/c4lc00662c >

Hermans C., Bernard A. « Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers ». *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* [En ligne]. février 1999. Vol. 159, n°2, p. 646‑678. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.159.2.9806064 >

Ho C., Lam C., Chan M., Cheung R., Law L., Lit L., Ng K., Suen M., Tai H. « Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications ». *Clin. Biochem. Rev.* février 2003. Vol. 24, n°1, p. 3‑12.

Hogan M. C., Manganelli L., Woollard J. R., Masyuk A. I., Masyuk T. V., Tammachote R., Huang B. Q., Leontovich A. A., Beito T. G., Madden B. J., Charlesworth M. C., Torres V. E., LaRusso N. F., Harris P. C., Ward C. J. « Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles ». *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* [En ligne]. février 2009. Vol. 20, n°2, p. 278‑288. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2008060564 >

Hollingsworth J. M., Miller D. C., Daignault S., Hollenbeck B. K. « Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect ». *J. Natl. Cancer Inst.* [En ligne]. 20 septembre 2006. Vol. 98, n°18, p. 1331‑1334. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djj362 >

Hong B. S., Cho J.-H., Kim H., Choi E.-J., Rho S., Kim J., Kim J. H., Choi D.-S., Kim Y.-K., Hwang D., Gho Y. S. « Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells ». *BMC Genomics* [En ligne]. 2009. Vol. 10, p. 556. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-556 >

Hong C.-S., Muller L., Whiteside T. L., Boyiadzis M. « Plasma Exosomes as Markers of Therapeutic Response in Patients with Acute Myeloid Leukemia ». *Front. Immunol.* [En ligne]. 10 avril 2014. Vol. 5,. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00160 > (consulté le 24 mai 2015)

Hortin G. L. « The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome ». *Clin. Chem.* [En ligne]. juillet 2006. Vol. 52, n°7, p. 1223‑1237. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2006.069252 >

Hortin G. L., Meilinger B., Drake S. K. « Size-Selective Extraction of Peptides from Urine for Mass Spectrometric Analysis ». *Clin. Chem.* [En ligne]. 6 janvier 2004. Vol. 50, n°6, p. 1092‑1095. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2003.030742 >

Hsieh S.-Y., Chen R.-K., Pan Y.-H., Lee H.-L. « Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling ». *Proteomics* [En ligne]. mai 2006. Vol. 6, n°10, p. 3189‑3198. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200500535 >

Hsu C., Morohashi Y., Yoshimura S., Manrique-Hoyos N., Jung S., Lauterbach M. A., Bakhti M., Grønborg M., Möbius W., Rhee J., Barr F. A., Simons M. « Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C ». *J. Cell Biol.* [En ligne]. 19 avril 2010. Vol. 189, n°2, p. 223‑232. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200911018 >

Hunter M. P., Ismail N., Zhang X., Aguda B. D., Lee E. J., Yu L., Xiao T., Schafer J., Lee M.-L. T., Schmittgen T. D., Nana-Sinkam S. P., Jarjoura D., Marsh C. B. « Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles ». *PloS One* [En ligne]. 2008. Vol. 3, n°11, p. e3694. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003694 >

Hu S., Loo J. A., Wong D. T. « Human body fluid proteome analysis ». *Proteomics* [En ligne]. décembre 2006. Vol. 6, n°23, p. 6326‑6353. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600284 >

Jeanson L., Guerrera I. C., Papon J.-F., Chhuon C., Zadigue P., Prulière-Escabasse V., Amselem S., Escudier E., Coste A., Edelman A. « Proteomic Analysis of Nasal Epithelial Cells from Cystic Fibrosis Patients ». *PLoS ONE* [En ligne]. 30 septembre 2014. Vol. 9, n°9,. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108671 > (consulté le 8 juillet 2015)

Jeanson L., Kelly M., Coste A., Guerrera I. C., Fritsch J., Nguyen-Khoa T., Baudouin-Legros M., Papon J.-F., Zadigue P., Prulière-Escabasse V., Amselem S., Escudier E., Edelman A. « Oxidative stress induces unfolding protein response and inflammation in nasal polyposis ». *Allergy* [En ligne]. mars 2012. Vol. 67, n°3, p. 403‑412. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02769.x >

Jellum E., Bjørnson I., Nesbakken R., Johansson E., Wold S. « Classification of human cancer cells by means of capillary gas chromatography and pattern recognition analysis ». *J. Chromatogr.* 6 novembre 1981. Vol. 217, p. 231‑237.

Johnstone R. M., Adam M., Hammond J. R., Orr L., Turbide C. « Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) ». *J. Biol. Chem.* 5 juillet 1987. Vol. 262, n°19, p. 9412‑9420.

Jonasch E., Gao J., Rathmell W. K. « Renal cell carcinoma ». *The BMJ* [En ligne]. 10 novembre 2014. Vol. 349, p. g4797. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1136/bmj.g4797 >

Kahlert C., Melo S. A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., Kalluri R. « Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 14 février 2014. Vol. 289, n°7, p. 3869‑3875. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C113.532267 >

Kaiser T., Wittke S., Just I., Krebs R., Bartel S., Fliser D., Mischak H., Weissinger E. M. « Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometer for automated and robust polypeptide determination in body fluids for clinical use ». *Electrophoresis* [En ligne]. juillet 2004. Vol. 25, n°13, p. 2044‑2055. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/elps.200305788 >

Kalra H., Adda C. G., Liem M., Ang C.-S., Mechler A., Simpson R. J., Hulett M. D., Mathivanan S. « Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma ». *Proteomics* [En ligne]. 30 septembre 2013. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201300282 >

Kalra H., Simpson R. J., Ji H., Aikawa E., Altevogt P., Askenase P., Bond V. C., Borràs F. E., Breakefield X., Budnik V., Buzas E., Camussi G., Clayton A., Cocucci E., Falcon-Perez J. M., Gabrielsson S., Gho Y. S., Gupta D., Harsha H. C., Hendrix A., Hill A. F., Inal J. M., Jenster G., Krämer-Albers E.-M., Lim S. K., Llorente A., Lötvall J., Marcilla A., Mincheva-Nilsson L., Nazarenko I., Nieuwland R., Nolte-’t Hoen E. N. M., Pandey A., Patel T., Piper M. G., Pluchino S., Prasad T. S. K., Rajendran L., Raposo G., Record M., Reid G. E., Sánchez-Madrid F., Schiffelers R. M., Siljander P., Stensballe A., Stoorvogel W., Taylor D., Thery C., Valadi H., Van Balkom B. W. M., Vázquez J., Vidal M., Wauben M. H. M., Yáñez-Mó M., Zoeller M., Mathivanan S. « Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation ». *PLoS Biol.* [En ligne]. décembre 2012. Vol. 10, n°12,. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450 > (consulté le 24 mai 2015)

Kamath K. S., Kumar S. S., Kaur J., Venkatakrishnan V., Paulsen I. T., Nevalainen H., Molloy M. P. « Proteomics of hosts and pathogens in cystic fibrosis ». *Proteomics Clin. Appl.* [En ligne]. février 2015. Vol. 9, n°1-2, p. 134‑146. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/prca.201400122 >

Kanwar S. S., Dunlay C. J., Simeone D. M., Nagrath S. « Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes ». *Lab. Chip* [En ligne]. 7 juin 2014. Vol. 14, n°11, p. 1891‑1900. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1039/c4lc00136b >

Karas M., Hillenkamp F. « Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons ». *Anal. Chem.* [En ligne]. 1 octobre 1988. Vol. 60, n°20, p. 2299‑2301. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/ac00171a028 >

Kassis S., Lauter C. J., Stojanov M., Salem N. « Exfoliation of the beta-adrenergic receptor and the regulatory components of adenylate cyclase by cultured rat glioma C6 cells ». *Biochim. Biophys. Acta*. 29 mai 1986. Vol. 886, n°3, p. 474‑482.

Kato M., Miyazawa K., Kitamura N. « A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 1 décembre 2000. Vol. 275, n°48, p. 37481‑37487. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M007251200 >

Katzmann D. J., Babst M., Emr S. D. « Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I ». *Cell*. 27 juillet 2001. Vol. 106, n°2, p. 145‑155.

Katzmann D. J., Stefan C. J., Babst M., Emr S. D. « Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting ». *J. Cell Biol.* [En ligne]. 4 août 2003. Vol. 162, n°3, p. 413‑423. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200302136 >

Kentsis A., Monigatti F., Dorff K., Campagne F., Bachur R., Steen H. « Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry ». *Proteomics Clin. Appl.* [En ligne]. 1 septembre 2009. Vol. 3, n°9, p. 1052‑1061. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/prca.200900008 >

Kim D.-K., Lee J., Simpson R. J., Lötvall J., Gho Y. S. « EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research ». *Semin. Cell Dev. Biol.* [En ligne]. avril 2015. Vol. 40, p. 4‑7. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.005 >

Klibi J., Niki T., Riedel A., Pioche-Durieu C., Souquere S., Rubinstein E., Le Moulec S., Moulec S. L. E., Guigay J., Hirashima M., Guemira F., Adhikary D., Mautner J., Busson P. « Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr

virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells ». *Blood* [En ligne]. 26 février 2009. Vol. 113, n°9, p. 1957‑1966. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-02-142596 >

Knoll T., Zöllner A., Wendt-Nordahl G., Michel M. S., Alken P. « Cystinuria in childhood and adolescence: recommendations for diagnosis, treatment, and follow-up ». *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* [En ligne]. janvier 2005. Vol. 20, n°1, p. 19‑24. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1007/s00467-004-1663-1 >

Kohler M., Schänzer W., Thevis M. « Effects of exercise on the urinary proteome ». *Adv. Exp. Med. Biol.* [En ligne]. 2015. Vol. 845, p. 121‑131. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-9523-4_12 >

Koles K., Nunnari J., Korkut C., Barria R., Brewer C., Li Y., Leszyk J., Zhang B., Budnik V. « Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 11 mai 2012. Vol. 287, n°20, p. 16820‑16834. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.342667 >

Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Weglarczyk K., Baran J., Urbanowicz B., Brański P., Ratajczak M. Z., Zembala M. « Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes ». *Cancer Immunol. Immunother. CII* [En ligne]. juillet 2006. Vol. 55, n°7, p. 808‑818. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1007/s00262-005-0075-9 >

Lacroix C., Caubet C., Gonzalez-de-Peredo A., Breuil B., Bouyssié D., Stella A., Garrigues L., Le Gall C., Raevel A., Massoubre A., Klein J., Decramer S., Sabourdy F., Bandin F., Burlet-Schiltz O., Monsarrat B., Schanstra J.-P., Bascands J.-L. « Label-free quantitative urinary proteomics identifies the arginase pathway as a new player in congenital obstructive nephropathy ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. décembre 2014. Vol. 13, n°12, p. 3421‑3434. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M114.040121 >

Lange V., Picotti P., Domon B., Aebersold R. « Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial ». *Mol. Syst. Biol.* [En ligne]. 14 octobre 2008. Vol. 4, p. 222. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/msb.2008.61 >

Lescuyer P., Hochstrasser D., Rabilloud T. « How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery? ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. septembre 2007. Vol. 6, n°9, p. 3371‑3376. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr0702060 >

Levänen B., Bhakta N. R., Torregrosa Paredes P., Barbeau R., Hiltbrunner S., Pollack J. L., Sköld C. M., Svartengren M., Grunewald J., Gabrielsson S., Eklund A., Larsson B.-M., Woodruff P. G., Erle D. J., Wheelock Å. M. « Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients ». *J. Allergy Clin. Immunol.* [En ligne]. mars 2013. Vol. 131, n°3, p. 894‑903. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.039 >

Levey A. S., Bosch J. P., Lewis J. B., Greene T., Rogers N., Roth D. « A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group ». *Ann. Intern. Med.* 16 mars 1999. Vol. 130, n°6, p. 461‑470.

Lin D., Alborn W. E., Slebos R. J. C., Liebler D. C. « Comparison of Protein Immunoprecipitation-Multiple Reaction Monitoring with ELISA for Assay of Biomarker Candidates in Plasma ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. 6 décembre 2013. Vol. 12, n°12, p. 5996‑6003. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr400877e >

Li Y., Zhang Y., Qiu F., Qiu Z. « Proteomic identification of exosomal LRG1: A potential urinary biomarker for detecting NSCLC ». *ELECTROPHORESIS* [En ligne]. 1 août 2011. Vol. 32, n°15, p. 1976‑1983. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/elps.201000598 >

Loftheim H., Midtvedt K., Hartmann A., Reisæter A. V., Falck P., Holdaas H., Jenssen T., Reubsaet L., Åsberg A. « Urinary proteomic shotgun approach for identification of potential acute rejection biomarkers in renal transplant recipients ». *Transplant. Res.* [En ligne]. 31 août 2012. Vol. 1, p. 9. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1186/2047-1440-1-9 >

Logan M. R., Lacy P., Odemuyiwa S. O., Steward M., Davoine F., Kita H., Moqbel R. « A critical role for vesicle-associated membrane protein-7 in exocytosis from human eosinophils and neutrophils ». *Allergy* [En ligne]. juin 2006. Vol. 61, n°6, p. 777‑784. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01089.x >

Looze C., Yui D., Leung L., Ingham M., Kaler M., Yao X., Wu W. W., Shen R.-F., Daniels M. P., Levine S. J. « Proteomic Profiling of Human Plasma Exosomes Identifies PPARγ as an Exosome-associated Protein ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [En ligne]. 16 janvier 2009. Vol. 378, n°3, p. 433‑438. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.050 >

Lopez M. F., Mikulskis A., Kuzdzal S., Bennett D. A., Kelly J., Golenko E., DiCesare J., Denoyer E., Patton W. F., Ediger R., Sapp L., Ziegert T., Lynch C., Kramer S., Whiteley G. R., Wall M. R., Mannion D. P., Della Cioppa G., Rakitan J. S., Wolfe G. M. « High-resolution serum proteomic profiling of Alzheimer disease samples reveals disease-specific, carrier-protein-bound mass signatures ». *Clin. Chem.* [En ligne]. octobre 2005. Vol. 51, n°10, p. 1946‑1954. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.053090 >

Luketic L., Delanghe J., Sobol P. T., Yang P., Frotten E., Mossman K. L., Gauldie J., Bramson J., Wan Y. « Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 15 octobre 2007. Vol. 179, n°8, p. 5024‑5032.

Lv L.-L., Cao Y., Liu D., Xu M., Liu H., Tang R.-N., Ma K.-L., Liu B.-C. « Isolation and Quantification of MicroRNAs from Urinary Exosomes/Microvesicles for Biomarker Discovery ». *Int. J. Biol. Sci.* [En ligne]. 12 octobre 2013. Vol. 9, n°10, p. 1021‑1031. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.6100 >

MacGregor G., Gray R. D., Hilliard T. N., Imrie M., Boyd A. C., Alton E. W. F. W., Bush A., Davies J. C., Innes J. A., Porteous D. J., Greening A. P. « Biomarkers for cystic fibrosis lung disease: application of SELDI-TOF mass spectrometry to BAL fluid ». *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* [En ligne]. septembre 2008. Vol. 7, n°5, p. 352‑358. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2007.12.005 >

Martinez-Pinna R., De Peredo A. G., Monsarrat B., Burlet-Schiltz O., Martin-Ventura J. L. « Label-free quantitative proteomic analysis of human plasma-derived microvesicles to find protein signatures of abdominal aortic aneurysms ». *PROTEOMICS – Clin. Appl.* [En ligne]. 1 août 2014. Vol. 8, n°7-8, p. 620‑625. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/prca.201400010 >

Marzesco A.-M., Janich P., Wilsch-Bräuninger M., Dubreuil V., Langenfeld K., Corbeil D., Huttner W. B. « Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells ». *J. Cell Sci.* [En ligne]. 7 janvier 2005. Vol. 118, n°13, p. 2849‑2858. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02439 >

Mathivanan S., Ji H., Simpson R. J. « Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication ». *J. Proteomics* [En ligne]. 10 septembre 2010. Vol. 73, n°10, p. 1907‑1920. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006 >

Meyer K. C., Raghu G., Baughman R. P., Brown K. K., Costabel U., Du Bois R. M., Drent M., Haslam P. L., Kim D. S., Nagai S., Rottoli P., Saltini C., Selman M., Strange C., Wood B., American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease. « An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease ». *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* [En ligne]. 1 mai 2012. Vol. 185, n°9, p. 1004‑1014. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201202-0320ST >

Miyanishi M., Tada K., Koike M., Uchiyama Y., Kitamura T., Nagata S. « Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor ». *Nature* [En ligne]. 15 novembre 2007. Vol. 450, n°7168, p. 435‑439. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nature06307 >

Moon P.-G., Lee J.-E., You S., Kim T.-K., Cho J.-H., Kim I.-S., Kwon T.-H., Kim C.-D., Park S.-H., Hwang D., Kim Y.-L., Baek M.-C. « Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy ». *Proteomics* [En ligne]. juin 2011. Vol. 11, n°12, p. 2459‑2475. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201000443 >

Morelli A. E., Larregina A. T., Shufesky W. J., Sullivan M. L. G., Stolz D. B., Papworth G. D., Zahorchak A. F., Logar A. J., Wang Z., Watkins S. C., Falo L. D., Thomson A. W. « Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells ». *Blood* [En ligne]. 15 novembre 2004. Vol. 104, n°10, p. 3257‑3266. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824 >

Mullen W., Albalat A., Gonzalez J., Zerefos P., Siwy J., Franke J., Mischak H. « Performance of different separation methods interfaced in the same MS-reflection TOF detector: a comparison of performance between CE versus HPLC for biomarker analysis ». *Electrophoresis* [En ligne]. février 2012. Vol. 33, n°4, p. 567‑574. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/elps.201100415 >

Muntasell A., Berger A. C., Roche P. A. « T cell-induced secretion of MHC class II–peptide complexes on B cell exosomes ». *EMBO J.* [En ligne]. 3 octobre 2007. Vol. 26, n°19, p. 4263‑4272. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601842 >

Murray K. K., Boyd R. K., Eberlin M. N., Langley G. J., Li L., Naito Y. « Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013) ». *Pure Appl. Chem.* 6 juin 2013. Vol. 85, n°7, p. 1515‑1609.

Musante L., Tataruch D. E., Holthofer H. « Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy ». *Front. Endocrinol.* [En ligne]. 2014. Vol. 5, p. 149. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.00149 >

Nanni P., Levander F., Roda G., Caponi A., James P., Roda A. « A label-free nano-liquid chromatography-mass spectrometry approach for quantitative serum peptidomics in Crohn's disease patients ». *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* [En ligne]. 1 octobre 2009. Vol. 877, n°27, p. 3127‑3136. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.08.003 >

Neusüss C., Pelzing M., Macht M. « A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry ». *Electrophoresis*

[En ligne]. septembre 2002. Vol. 23, n°18, p. 3149‑3159. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683(200209)23:18<3149::AID-ELPS3149>3.0.CO;2-8 >

Nguyen E. V., Gharib S. A., Palazzo S. J., Chow Y., Goodlett D. R., Schnapp L. M. « Proteomic profiling of bronchoalveolar lavage fluid in critically ill patients with ventilator-associated pneumonia ». *PloS One* [En ligne]. 2013. Vol. 8, n°3, p. e58782. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058782 >

Nguyen E. V., Gharib S. A., Schnapp L. M., Goodlett D. R. « Shotgun MS proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in normal subjects ». *Proteomics Clin. Appl.* [En ligne]. octobre 2014. Vol. 8, n°9-10, p. 737‑747. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/prca.201300018 >

Van Niel G., Raposo G., Candalh C., Boussac M., Hershberg R., Cerf-Bensussan N., Heyman M. « Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles ». *Gastroenterology*. août 2001. Vol. 121, n°2, p. 337‑349.

Noël-Georis I., Bernard A., Falmagne P., Wattiez R. « Proteomics as the tool to search for lung disease markers in bronchoalveolar lavage ». *Dis. Markers*. 2001. Vol. 17, n°4, p. 271‑284.

Nolte-’t Hoen E. N. M., Buermans H. P. J., Waasdorp M., Stoorvogel W., Wauben M. H. M., ’t Hoen P. A. C. « Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. octobre 2012. Vol. 40, n°18, p. 9272‑9285. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks658 >

Nolte-’t Hoen E. N. M., Buschow S. I., Anderton S. M., Stoorvogel W., Wauben M. H. M. « Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1 ». *Blood* [En ligne]. 26 février 2009. Vol. 113, n°9, p. 1977‑1981. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-08-174094 >

Ogawa Y., Miura Y., Harazono A., Kanai-Azuma M., Akimoto Y., Kawakami H., Yamaguchi T., Toda T., Endo T., Tsubuki M., Yanoshita R. « Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva ». *Biol. Pharm. Bull.* 2011. Vol. 34, n°1, p. 13‑23.

Old W. M., Meyer-Arendt K., Aveline-Wolf L., Pierce K. G., Mendoza A., Sevinsky J. R., Resing K. A., Ahn N. G. « Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. octobre 2005. Vol. 4, n°10, p. 1487‑1502. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M500084-MCP200 >

Ollero M., Brouillard F., Edelman A. « Cystic fibrosis enters the proteomics scene: new answers to old questions ». *Proteomics* [En ligne]. juillet 2006. Vol. 6, n°14, p. 4084‑4099. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600028 >

Omenn G. S., States D. J., Adamski M., Blackwell T. W., Menon R., Hermjakob H., Apweiler R., Haab B. B., Simpson R. J., Eddes J. S., Kapp E. A., Moritz R. L., Chan D. W., Rai A. J., Admon A., Aebersold R., Eng J., Hancock W. S., Hefta S. A., Meyer H., Paik Y.-K., Yoo J.-S., Ping P., Pounds J., Adkins J., Qian X., Wang R., Wasinger V., Wu C. Y., Zhao X., Zeng R., Archakov A., Tsugita A., Beer I., Pandey A., Pisano M., Andrews P., Tammen H., Speicher D. W., Hanash S. M. « Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database ». *Proteomics* [En ligne]. août 2005. Vol. 5, n°13, p. 3226‑3245. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200500358 >

Ong S.-E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M. « Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics ». *Mol. Cell. Proteomics* [En ligne]. 5 janvier 2002. Vol. 1, n°5, p. 376‑386. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M200025-MCP200 >

Ong S.-E., Foster L. J., Mann M. « Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics ». *Methods San Diego Calif*. février 2003. Vol. 29, n°2, p. 124‑130.

Ostrowski M., Carmo N. B., Krumeich S., Fanget I., Raposo G., Savina A., Moita C. F., Schauer K., Hume A. N., Freitas R. P., Goud B., Benaroch P., Hacohen N., Fukuda M., Desnos C., Seabra M. C., Darchen F., Amigorena S., Moita L. F., Thery C. « Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway ». *Nat. Cell Biol.* [En ligne]. janvier 2010. Vol. 12, n°1, p. 19‑30; sup pp 1‑13. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/ncb2000 >

Pan B.-T., Johnstone R. M. « Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor ». *Cell* [En ligne]. juillet 1983. Vol. 33, n°3, p. 967‑978. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5 >

Parolini I., Federici C., Raggi C., Lugini L., Palleschi S., De Milito A., Coscia C., Iessi E., Logozzi M., Molinari A., Colone M., Tatti M., Sargiacomo M., Fais S. « Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 4 décembre 2009. Vol. 284, n°49, p. 34211‑34222. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.041152 > (consulté le 22 mai 2012)

Peterson A. C., Russell J. D., Bailey D. J., Westphall M. S., Coon J. J. « Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. novembre 2012. Vol. 11, n°11, p. 1475‑1488. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.O112.020131 >

Petricoin E. F., Ardekani A. M., Hitt B. A., Levine P. J., Fusaro V. A., Steinberg S. M., Mills G. B., Simone C., Fishman D. A., Kohn E. C., Liotta L. A. « Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer ». *Lancet* [En ligne]. 16 février 2002. Vol. 359, n°9306, p. 572‑577. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07746-2 >

Picotti P., Aebersold R. « Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions ». *Nat. Methods* [En ligne]. juin 2012. Vol. 9, n°6, p. 555‑566. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2015 >

Pieper R., Gatlin C. L., McGrath A. M., Makusky A. J., Mondal M., Seonarain M., Field E., Schatz C. R., Estock M. A., Ahmed N., Anderson N. G., Steiner S. « Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots ». *Proteomics* [En ligne]. avril 2004. Vol. 4, n°4, p. 1159‑1174. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200300661 >

Pisitkun T., Gandolfo M. T., Das S., Knepper M. A., Bagnasco S. M. « Application of systems biology principles to protein biomarker discovery: Urinary exosomal proteome in renal transplantation ». *Proteomics Clin. Appl.* [En ligne]. 29 mai 2012. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/prca.201100108 > (consulté le 13 juin 2012)

Pisitkun T., Shen R.-F., Knepper M. A. « Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 7 septembre 2004. Vol. 101, n°36, p. 13368‑13373. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0403453101 >

Polanski M., Anderson N. L. « A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics ». *Biomark. Insights*. 2007. Vol. 1, p. 1‑48.

Poliakov A., Spilman M., Dokland T., Amling C. L., Mobley J. A. « Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen ». *The Prostate* [En ligne]. 1 février 2009. Vol. 69, n°2, p. 159‑167. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pros.20860 >

Pressac M. « [Tamm-Horsfall protein] ». *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. avril 2000. Vol. 58, n°2, p. 167‑176.

Proux-Gillardeaux V., Raposo G., Irinopoulou T., Galli T. « Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration ». *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* [En ligne]. mai 2007. Vol. 99, n°5, p. 261‑271. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1042/BC20060097 >

Prunotto M., Farina A., Lane L., Pernin A., Schifferli J., Hochstrasser D. F., Lescuyer P., Moll S. « Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine ». *J. Proteomics* [En ligne]. 30 janvier 2013. Vol. 82,. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.012 >

Puri N., Roche P. A. « Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 19

février 2008. Vol. 105, n°7, p. 2580‑2585. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0707854105 >

Qazi K. R., Torregrosa Paredes P., Dahlberg B., Grunewald J., Eklund A., Gabrielsson S. « Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis ». *Thorax* [En ligne]. novembre 2010. Vol. 65, n°11, p. 1016‑1024. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1136/thx.2009.132027 >

Quintana L. F., Campistol J. M., Alcolea M. P., Bañon-Maneus E., Sol-González A., Cutillas P. R. « Application of Label-free Quantitative Peptidomics for the Identification of Urinary Biomarkers of Kidney Chronic Allograft Dysfunction ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. juillet 2009. Vol. 8, n°7, p. 1658‑1673. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M900059-MCP200 >

Quon B. S., Dai D. L. Y., Hollander Z., Ng R. T., Tebbutt S. J., Man S. F. P., Wilcox P. G., Sin D. D. « Discovery of novel plasma protein biomarkers to predict imminent cystic fibrosis pulmonary exacerbations using multiple reaction monitoring mass spectrometry ». *Thorax* [En ligne]. 16 mars 2015. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206710 >

Raimondo F., Morosi L., Chinello C., Magni F., Pitto M. « Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery ». *Proteomics* [En ligne]. février 2011. Vol. 11, n°4, p. 709‑720. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201000422 >

Raimondo F., Morosi L., Corbetta S., Chinello C., Brambilla P., Della Mina P., Villa A., Albo G., Battaglia C., Bosari S., Magni F., Pitto M. « Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes ». *Mol. Biosyst.* [En ligne]. 19 mars 2013. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1039/c3mb25582d >

Raj D. A. A., Fiume I., Capasso G., Pocsfalvi G. « A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes ». *Kidney Int.* [En ligne]. 14 mars 2012. Vol. 81, n°12, p. 1263‑1272. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/ki.2012.25 >

Rao S. K., Huynh C., Proux-Gillardeaux V., Galli T., Andrews N. W. « Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 7 mai 2004. Vol. 279, n°19, p. 20471‑20479. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M400798200 >

Raposo G., Nijman H. W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding C. V., Melief C. J., Geuze H. J. « B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles ». *J. Exp. Med.* 1 mars 1996. Vol. 183, n°3, p. 1161‑1172.

Ray S., Reddy P. J., Jain R., Gollapalli K., Moiyadi A., Srivastava S. « Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: Advances and challenges ahead ». *PROTEOMICS* [En ligne]. 1 juin 2011. Vol. 11, n°11, p. 2139‑2161. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201000460 >

Rifai N., Gillette M. A., Carr S. A. « Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility ». *Nat. Biotechnol.* [En ligne]. août 2006. Vol. 24, n°8, p. 971‑983. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nbt1235 >

Robertson E. A., Van Steirteghem A. C., Byrkit J. E., Young D. S. « Biochemical individuality and the recognition of personal profiles with a computer ». *Clin. Chem.* janvier 1980. Vol. 26, n°1, p. 30‑36.

Rodby R. A., Rohde R. D., Sharon Z., Pohl M. A., Bain R. P., Lewis E. J. « The urine protein to creatinine ratio as a predictor of 24-hour urine protein excretion in type 1 diabetic patients with nephropathy. The Collaborative Study Group ». *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* décembre 1995. Vol. 26, n°6, p. 904‑909.

Rodríguez M., Silva J., López-Alfonso A., López-Muñiz M. B., Peña C., Domínguez G., García J. M., López-Gónzalez A., Méndez M., Provencio M., García V., Bonilla F. « Different exosome cargo from plasma/bronchoalveolar lavage in non-small-cell lung cancer ». *Genes. Chromosomes Cancer* [En ligne]. septembre 2014. Vol. 53, n°9, p. 713‑724. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/gcc.22181 >

Rogers A., Kalakish S., Desai R. A., Assimos D. G. « Management of cystinuria ». *Urol. Clin. North Am.* [En ligne]. août 2007. Vol. 34, n°3, p. 347‑362. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.ucl.2007.04.006 >

Ronquist G., Brody I. « The prostasome: its secretion and function in man ». *Biochim. Biophys. Acta*. 9 septembre 1985. Vol. 822, n°2, p. 203‑218.

Rood I. M., Deegens J. K. J., Merchant M. L., Tamboer W. P. M., Wilkey D. W., Wetzels J. F. M., Klein J. B. « Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome ». *Kidney Int.* [En ligne]. octobre 2010. Vol. 78, n°8, p. 810‑816. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.262 >

Ross P. L., Huang Y. N., Marchese J. N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlet-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D. J. « Multiplexed Protein Quantitation in Saccharomyces cerevisiae Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents ». *Mol. Cell. Proteomics* [En ligne]. 12 janvier 2004. Vol. 3, n°12, p. 1154‑1169. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M400129-MCP200 >

Sabounchi-Schütt F., Aström J., Eklund A., Grunewald J., Bjellqvist B. « Detection and identification of human bronchoalveolar lavage proteins using narrow-range immobilized pH gradient DryStrip and the paper bridge sample application method ». *Electrophoresis* [En ligne]. mai 2001. Vol. 22, n°9, p. 1851‑1860. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683(200105)22:9<1851::AID-ELPS1851>3.0.CO;2-8 >

Santiago-Dieppa D. R., Steinberg J., Gonda D., Cheung V. J., Carter B. S., Chen C. C. « Extracellular vesicles as a platform for “liquid biopsy” in glioblastoma patients ». *Expert Rev. Mol. Diagn.* [En ligne]. septembre 2014. Vol. 14, n°7, p. 819‑825. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1586/14737159.2014.943193 >

Sassi A. P., Andel F., Bitter H.-M. L., Brown M. P. S., Chapman R. G., Espiritu J., Greenquist A. C., Guyon I., Horchi-Alegre M., Stults K. L., Wainright A., Heller J. C., Stults J. T. « An automated, sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry platform for discovery of biomarkers in

human serum ». *Electrophoresis* [En ligne]. avril 2005. Vol. 26, n°7-8, p. 1500‑1512. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/elps.200410127 >

Savina A., Vidal M., Colombo M. I. « The Exosome Pathway in K562 Cells Is Regulated by Rab11 ». *J. Cell Sci.* 15 juin 2002. Vol. 115, n°12, p. 2505‑2515.

Sawai S., Umemura H., Mori M., Satoh M., Hayakawa S., Kodera Y., Tomonaga T., Kuwabara S., Nomura F. « Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: proteomic analysis ». *J. Neuroimmunol.* [En ligne]. 25 janvier 2010. Vol. 218, n°1-2, p. 112‑115. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.10.019 >

Schaub S., Wilkins J., Weiler T., Sangster K., Rush D., Nickerson P. « Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ». *Kidney Int.* [En ligne]. janvier 2004. Vol. 65, n°1, p. 323‑332. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00352.x >

Schmidt A., Kellermann J., Lottspeich F. « A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels ». *Proteomics* [En ligne]. janvier 2005. Vol. 5, n°1, p. 4‑15. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200400873 >

Schrader M., Schulz-Knappe P., Fricker L. D. « Historical perspective of peptidomics ». *EuPA Open Proteomics* [En ligne]. juin 2014. Vol. 3, p. 171‑182. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.euprot.2014.02.014 >

Segura E., Guérin C., Hogg N., Amigorena S., Théry C. « CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 1 août 2007. Vol. 179, n°3, p. 1489‑1496.

De Seny D., Fillet M., Meuwis M.-A., Geurts P., Lutteri L., Ribbens C., Bours V., Wehenkel L., Piette J., Malaise M., Merville M.-P. « Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip

approach ». *Arthritis Rheum.* [En ligne]. décembre 2005. Vol. 52, n°12, p. 3801‑3812. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/art.21607 >

De Seny D., Fillet M., Ribbens C., Marée R., Meuwis M.-A., Lutteri L., Chapelle J.-P., Wehenkel L., Louis E., Merville M.-P., Malaise M. « Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis ». *Clin. Chem.* [En ligne]. juin 2008. Vol. 54, n°6, p. 1066‑1075. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.099549 >

Serafini-Cessi F., Malagolini N., Cavallone D. « Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance ». *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* octobre 2003. Vol. 42, n°4, p. 658‑676.

Shen Y., Jacobs J. M., Camp D. G., Fang R., Moore R. J., Smith R. D., Xiao W., Davis R. W., Tompkins R. G. « Ultra-high-efficiency strong cation exchange LC/RPLC/MS/MS for high dynamic range characterization of the human plasma proteome ». *Anal. Chem.* [En ligne]. 15 février 2004. Vol. 76, n°4, p. 1134‑1144. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/ac034869m >

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. « Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels ». *Anal. Chem.* 1 mars 1996. Vol. 68, n°5, p. 850‑858.

Shi T., Gao Y., Quek S. I., Fillmore T. L., Nicora C. D., Su D., Zhao R., Kagan J., Srivastava S., Rodland K. D., Liu T., Smith R. D., Chan D. W., Camp D. G., Liu A. Y., Qian W.-J. « A highly sensitive targeted mass spectrometric assay for quantification of AGR2 protein in human urine and serum ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. 7 février 2014. Vol. 13, n°2, p. 875‑882. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr400912c >

Shiwa M., Nishimura Y., Wakatabe R., Fukawa A., Arikuni H., Ota H., Kato Y., Yamori T. « Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12 septembre 2003. Vol. 309, n°1, p. 18‑25.

Simon R., Lemoine J., Fonbonne C., Jaffuel A., Léonard J.-F., Gautier J.-C., Pasquier O., Salvador A. « Absolute quantification of podocin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-multiple reaction monitoring cubed mass spectrometry ». *J. Pharm. Biomed. Anal.* [En ligne]. juin 2014. Vol. 94, p. 84‑91. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.01.019 >

Simpson R. J., Jensen S. S., Lim J. W. E. « Proteomic profiling of exosomes: current perspectives ». *Proteomics* [En ligne]. octobre 2008. Vol. 8, n°19, p. 4083‑4099. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200800109 >

Skog J., Würdinger T., Van Rijn S., Meijer D. H., Gainche L., Curry W. T., Carter B. S., Krichevsky A. M., Breakefield X. O. « Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers ». *Nat. Cell Biol.* [En ligne]. décembre 2008. Vol. 10, n°12, p. 1470‑1476. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/ncb1800 >

Skokos D., Botros H. G., Demeure C., Morin J., Peronet R., Birkenmeier G., Boudaly S., Mécheri S. « Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 15 mars 2003. Vol. 170, n°6, p. 3037‑3045.

Spahr C. S., Davis M. T., McGinley M. D., Robinson J. H., Bures E. J., Beierle J., Mort J., Courchesne P. L., Chen K., Wahl R. C., Yu W., Luethy R., Patterson S. D. « Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling an unfractionated tryptic digest ». *Proteomics* [En ligne]. janvier 2001. Vol. 1, n°1, p. 93‑107. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/1615-9861(200101)1:1<93::AID-PROT93>3.0.CO;2-3 >

Stoeck A., Keller S., Riedle S., Sanderson M. P., Runz S., Le Naour F., Gutwein P., Ludwig A., Rubinstein E., Altevogt P. « A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44 ». *Biochem. J.* [En ligne]. 1 février 2006. Vol. 393, n°Pt 3, p. 609‑618. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1042/BJ20051013 >

Stuffers S., Sem Wegner C., Stenmark H., Brech A. « Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs ». *Traffic Cph. Den.* [En ligne]. juillet 2009. Vol. 10, n°7, p. 925‑937. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x >

Sun W., Li F., Wu S., Wang X., Zheng D., Wang J., Gao Y. « Human urine proteome analysis by three separation approaches ». *Proteomics* [En ligne]. décembre 2005. Vol. 5, n°18, p. 4994‑5001. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401334 >

Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T. « Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry ». *Rapid Commun. Mass Spectrom.* [En ligne]. 1 août 1988. Vol. 2, n°8, p. 151‑153. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1290020802 >

Tauro B. J., Greening D. W., Mathias R. A., Ji H., Mathivanan S., Scott A. M., Simpson R. J. « Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes ». *Methods San Diego Calif* [En ligne]. 21 janvier 2012. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.002 > (consulté le 13 mars 2012)

Teis D., Saksena S., Judson B. L., Emr S. D. « ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation ». *EMBO J.* [En ligne]. 3 mars 2010. Vol. 29, n°5, p. 871‑883. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.408 >

Theodorescu D., Fliser D., Wittke S., Mischak H., Krebs R., Walden M., Ross M., Eltze E., Bettendorf O., Wulfing C., Semjonow A. « Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine ». *Electrophoresis* [En ligne]. juillet 2005. Vol. 26, n°14, p. 2797‑2808. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/elps.200400208 >

Theodorescu D., Wittke S., Ross M. M., Walden M., Conaway M., Just I., Mischak H., Frierson H. F. « Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a

prospective analysis ». *Lancet Oncol.* [En ligne]. mars 2006. Vol. 7, n°3, p. 230‑240. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70584-8 >

Théry C., Boussac M., Véron P., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Garin J., Amigorena S. « Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 15 juin 2001. Vol. 166, n°12, p. 7309‑7318.

Théry C., Ostrowski M., Segura E. « Membrane vesicles as conveyors of immune responses ». *Nat. Rev. Immunol.* [En ligne]. août 2009. Vol. 9, n°8, p. 581‑593. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nri2567 >

Théry C., Regnault A., Garin J., Wolfers J., Zitvogel L., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S. « Molecular Characterization of Dendritic Cell-Derived Exosomes ». *J. Cell Biol.* 1 novembre 1999. Vol. 147, n°3, p. 599‑610.

Thompson A., Schäfer J., Kuhn K., Kienle S., Schwarz J., Schmidt G., Neumann T., Hamon C. « Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS ». *Anal. Chem.* [En ligne]. 1 avril 2003. Vol. 75, n°8, p. 1895‑1904. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/ac0262560 >

Tian T., Wang Y., Wang H., Zhu Z., Xiao Z. « Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy ». *J. Cell. Biochem.* [En ligne]. 1 octobre 2010. Vol. 111, n°2, p. 488‑496. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/jcb.22733 >

Tickner J. A., Urquhart A. J., Stephenson S.-A., Richard D. J., O'Byrne K. J. « Functions and Therapeutic Roles of Exosomes in Cancer ». *Front. Oncol.* [En ligne]. 27 mai 2014. Vol. 4,. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00127 > (consulté le 25 mars 2015)

Tirumalai R. S., Chan K. C., Prieto D. A., Issaq H. J., Conrads T. P., Veenstra T. D. « Characterization of the low molecular weight human serum proteome ». *Mol. Cell. Proteomics MCP* [En ligne]. octobre 2003. Vol. 2, n°10, p. 1096‑1103. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M300031-MCP200 >

Tomlinson P. R., Zheng Y., Fischer R., Heidasch R., Gardiner C., Evetts S., Hu M., Wade-Martins R., Turner M. R., Morris J., Talbot K., Kessler B. M., Tofaris G. K. « Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease ». *Ann. Clin. Transl. Neurol.* [En ligne]. avril 2015. Vol. 2, n°4, p. 353‑361. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/acn3.175 >

Torregrosa Paredes P., Esser J., Admyre C., Nord M., Rahman Q. K., Lukic A., Rådmark O., Grönneberg R., Grunewald J., Eklund A., Scheynius A., Gabrielsson S. « Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma ». *Allergy* [En ligne]. juillet 2012. Vol. 67, n°7, p. 911‑919. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02835.x >

Trams E. G., Lauter C. J., Norman Salem J., Heine U. « Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles ». *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* [En ligne]. 6 juin 1981. Vol. 645, n°1, p. 63‑70. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5 >

Traxer O., Lechevallier E., Saussine C. « [Cystinuria: diagnosis and management] ». *Prog. En Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol.* [En ligne]. décembre 2008. Vol. 18, n°12, p. 832‑836. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.purol.2008.09.036 >

Tremlett H., Dai D. L. Y., Hollander Z., Kapanen A., Aziz T., Wilson-McManus J. E., Tebbutt S. J., Borchers C. H., Oger J., Cohen Freue G. V. « Serum proteomics in multiple sclerosis disease progression ». *J. Proteomics* [En ligne]. 6 avril 2015. Vol. 118, p. 2‑11. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.018 >

Tsai T.-H., Song E., Zhu R., Di Poto C., Wang M., Luo Y., Varghese R. S., Tadesse M. G., Ziada D. H., Desai C. S., Shetty K., Mechref Y., Ressom H. W. « LC-MS/MS based Serum Proteomics for Identification of Candidate Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma ». *Proteomics* [En ligne]. 16 mars 2015. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201400364 >

Tsou C.-C., Avtonomov D., Larsen B., Tucholska M., Choi H., Gingras A.-C., Nesvizhskii A. I. « DIA-Umpire: comprehensive computational framework for data-independent acquisition

proteomics ». *Nat. Methods* [En ligne]. mars 2015. Vol. 12, n°3, p. 258‑264. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3255 >

Uehara K., Tominaga N., Shibagaki Y. « Adult orthostatic proteinuria ». *Clin. Kidney J.* [En ligne]. juin 2014. Vol. 7, n°3, p. 327‑328. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1093/ckj/sfu040 >

Urbanelli L., Magini A., Buratta S., Brozzi A., Sagini K., Polchi A., Tancini B., Emiliani C. « Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate ». *Genes* [En ligne]. 2013. Vol. 4, n°2, p. 152‑170. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.3390/genes4020152 >

Vaidyanathan K. « Urinary proteomics and metabolomics in the diagnosis of pediatric disorders ». *Proteomics Clin. Appl.* [En ligne]. 29 janvier 2015. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/prca.201400093 >

Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O. « Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells ». *Nat. Cell Biol.* [En ligne]. juin 2007. Vol. 9, n°6, p. 654‑659. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/ncb1596 >

Vargas A., Zhou S., Éthier-Chiasson M., Flipo D., Lafond J., Gilbert C., Barbeau B. « Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia ». *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* [En ligne]. août 2014. Vol. 28, n°8, p. 3703‑3719. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-239053 >

Veenstra T. D., Conrads T. P., Hood B. L., Avellino A. M., Ellenbogen R. G., Morrison R. S. « Biomarkers: Mining the Biofluid Proteome ». *Mol. Cell. Proteomics* [En ligne]. 4 janvier 2005. Vol. 4, n°4, p. 409‑418. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M500006-MCP200 >

Van ’t Veer L. J., Dai H., Van de Vijver M. J., He Y. D., Hart A. A. M., Mao M., Peterse H. L., Van der Kooy K., Marton M. J., Witteveen A. T., Schreiber G. J., Kerkhoven R. M., Roberts C., Linsley P. S., Bernards R., Friend S. H. « Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast

cancer ». *Nature* [En ligne]. 31 janvier 2002. Vol. 415, n°6871, p. 530‑536. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/415530a >

Vestergaard P., Leverett R. « Constancy of urinary creatinine excretion ». *J. Lab. Clin. Med.* février 1958. Vol. 51, n°2, p. 211‑218.

Villanueva J., Philip J., Entenberg D., Chaparro C. A., Tanwar M. K., Holland E. C., Tempst P. « Serum Peptide Profiling by Magnetic Particle-Assisted, Automated Sample Processing and MALDI-TOF Mass Spectrometry ». *Anal. Chem.* [En ligne]. 1 mars 2004. Vol. 76, n°6, p. 1560‑1570. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/ac0352171 >

Villanueva J., Shaffer D. R., Philip J., Chaparro C. A., Erdjument-Bromage H., Olshen A. B., Fleisher M., Lilja H., Brogi E., Boyd J., Sanchez-Carbayo M., Holland E. C., Cordon-Cardo C., Scher H. I., Tempst P. « Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns ». *J. Clin. Invest.* [En ligne]. janvier 2006. Vol. 116, n°1, p. 271‑284. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1172/JCI26022 >

Vingtdeux V., Sergeant N., Buée L. « Potential Contribution of Exosomes to the Prion-Like Propagation of Lesions in Alzheimer's Disease ». *Front. Physiol.* [En ligne]. 5 juillet 2012. Vol. 3,. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2012.00229 > (consulté le 16 avril 2015)

Vlassov A. V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. « Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials ». *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* [En ligne]. juillet 2012. Vol. 1820, n°7, p. 940‑948. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017 >

Wahlgren J., Karlson T. D. L., Brisslert M., Vaziri Sani F., Telemo E., Sunnerhagen P., Valadi H. « Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. septembre 2012. Vol. 40, n°17, p. e130. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks463 >

Wang M., You J., Bemis K. G., Tegeler T. J., Brown D. P. G. « Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis ». *Brief. Funct. Genomic.*

Proteomic. [En ligne]. septembre 2008. Vol. 7, n°5, p. 329‑339. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1093/bfgp/eln031 >

Wang Z., Hill S., Luther J. M., Hachey D. L., Schey K. L. « Proteomic analysis of urine exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT) ». *Proteomics* [En ligne]. janvier 2012. Vol. 12, n°2, p. 329‑338. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201100477 >

Weissinger E. M., Wittke S., Kaiser T., Haller H., Bartel S., Krebs R., Golovko I., Rupprecht H. D., Haubitz M., Hecker H., Mischak H., Fliser D. « Proteomic patterns established with capillary electrophoresis and mass spectrometry for diagnostic purposes ». *Kidney Int.* [En ligne]. 2004. Vol. 65, n°6, p. 2426‑2434. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00659.x >

Wieckowski E. U., Visus C., Szajnik M., Szczepanski M. J., Storkus W. J., Whiteside T. L. « Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes ». *J. Immunol. Baltim. Md 1950* [En ligne]. 15 septembre 2009. Vol. 183, n°6, p. 3720‑3730. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900970 >

Williams R. L., Urbé S. « The emerging shape of the ESCRT machinery ». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* [En ligne]. mai 2007. Vol. 8, n°5, p. 355‑368. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nrm2162 >

Wiśniewski J. R., Zougman A., Mann M. « Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. décembre 2009. Vol. 8, n°12, p. 5674‑5678. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr900748n >

Wolf-Yadlin A., Hautaniemi S., Lauffenburger D. A., White F. M. « Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks ». *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. [En ligne]. 3 avril 2007. Vol. 104, n°14, p. 5860‑5865. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608638104 >

Wollert T., Hurley J. H. « Molecular Mechanism of Multivesicular Body Biogenesis by ESCRT Complexes ». *Nature* [En ligne]. 8 avril 2010. Vol. 464, n°7290, p. 864‑869. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/nature08849 >

Wong K. A., Mein R., Wass M., Flinter F., Pardy C., Bultitude M., Thomas K. « The genetic diversity of cystinuria in a UK population of patients ». *BJU Int.* [En ligne]. 1 mars 2015. p. n/a‑n/a. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/bju.12894 >

Wright C. F., Hall A., Matthews F. E., Brayne C. « Biomarkers, Dementia, and Public Health ». *Ann. N. Y. Acad. Sci.* [En ligne]. 1 octobre 2009. Vol. 1180, n°1, p. 11‑19. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04942.x >

Xia J., Broadhurst D. I., Wilson M., Wishart D. S. « Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial ». *Metabolomics* [En ligne]. avril 2013. Vol. 9, n°2, p. 280‑299. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1007/s11306-012-0482-9 >

Yates J. R. « Mass spectrometry and the age of the proteome ». *J. Mass Spectrom. JMS* [En ligne]. janvier 1998. Vol. 33, n°1, p. 1‑19. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199801)33:1<1::AID-JMS624>3.0.CO;2-9 >

Yates J. R., McCormack A. L., Eng J. « Mining genomes with MS ». *Anal. Chem.* 1 septembre 1996. Vol. 68, n°17, p. 534A‑540A.

Yoshioka Y., Kosaka N., Konishi Y., Ohta H., Okamoto H., Sonoda H., Nonaka R., Yamamoto H., Ishii H., Mori M., Furuta K., Nakajima T., Hayashi H., Sugisaki H., Higashimoto H., Kato T., Takeshita F., Ochiya T. « Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen ». *Nat. Commun.* [En ligne]. 7 avril 2014. Vol. 5,. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4591 > (consulté le 24 mai 2015)

You B., Fronton L., Boyle H., Droz J.-P., Girard P., Tranchand B., Ribba B., Tod M., Chabaud S., Coquelin H., Fléchon A. « Predictive Value of Modeled AUCAFP-hCG, a Dynamic Kinetic Parameter Characterizing Serum Tumor Marker Decline in Patients With Nonseminomatous Germ Cell Tumor ». *Urology* [En ligne]. août 2010. Vol. 76, n°2, p. 423‑429.e2. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2010.02.049 >

You B., Harvey R., Henin E., Mitchell H., Golfier F., Savage P. M., Tod M., Wilbaux M., Freyer G., Seckl M. J. « Early prediction of treatment resistance in low-risk gestational trophoblastic neoplasia using population kinetic modelling of hCG measurements ». *Br. J. Cancer* [En ligne]. 14 mars 2013. Vol. 108, n°9, p. 1810‑1816. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.123 >

Zakharova L., Svetlova M., Fomina A. F. « T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor ». *J. Cell. Physiol.* [En ligne]. juillet 2007. Vol. 212, n°1, p. 174‑181. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21013 >

Zhang F., Chen J., Wang M., Drabier R. « A neural network approach to multi-biomarker panel discovery by high-throughput plasma proteomics profiling of breast cancer ». *BMC Proc.* [En ligne]. 20 décembre 2013. Vol. 7, n°Suppl 7, p. S10. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1186/1753-6561-7-S7-S10 >

Zhang Y., Li Y., Qiu F., Qiu Z. « Comprehensive analysis of low-abundance proteins in human urinary exosomes using peptide ligand library technology, peptide OFFGEL fractionation and nanoHPLC-chip-MS/MS ». *ELECTROPHORESIS* [En ligne]. 1 décembre 2010. Vol. 31, n°23-24, p. 3797‑3807. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/elps.201000401 >

Zhou H., Pisitkun T., Aponte A., Yuen P. S. T., Hoffert J. D., Yasuda H., Hu X., Chawla L., Shen R.-F., Knepper M. A., Star R. A. « Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury ». *Kidney Int.* [En ligne]. novembre 2006. Vol. 70, n°10, p. 1847‑1857. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5001874 >

Zhou H., Yuen P. S. T., Pisitkun T., Gonzales P. A., Yasuda H., Dear J. W., Gross P., Knepper M. A., Star R. A. « Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery ». *Kidney Int.* [En ligne]. 22 février 2006. Vol. 69, n°8, p. 1471‑1476. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5000273 >

Zhu W., Smith J. W., Huang C.-M. « Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics ». *J. Biomed. Biotechnol.* [En ligne]. 2010. Vol. 2010, p. 840518. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1155/2010/840518 >

Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S. « Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes ». *Nat. Med.* mai 1998. Vol. 4, n°5, p. 594‑600.

Zougman A., Pilch B., Podtelejnikov A., Kiehntopf M., Schnabel C., Kumar C., Mann M. « Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome ». *J. Proteome Res.* [En ligne]. janvier 2008. Vol. 7, n°1, p. 386‑399. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1021/pr070501k >

Zuberovic A., Ullsten S., Hellman U., Markides K. E., Bergquist J. « Capillary electrophoresis off-line matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of intact and digested proteins using cationic-coated capillaries ». *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* [En ligne]. 2004. Vol. 18, n°23, p. 2946‑2952. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1712 >

Zubiri I., Posada-Ayala M., Sanz-Maroto A., Calvo E., Martín-Lorenzo M., Gonzalez-Calero L., De la Cuesta F., Lopez J. A., Fernandez-Fernandez B., Ortiz A., Vivanco F., Alvarez-Llamas G. « Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis ». *J. Proteomics* [En ligne]. 6 novembre 2013. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.037 >

Zürbig P., Decramer S., Dakna M., Jantos J., Good D. M., Coon J. J., Bandin F., Mischak H., Bascands J.-L., Schanstra J. P. « A low molecular weight urinary proteome profile of human kidney

aging ». *Proteomics* [En ligne]. avril 2009. Vol. 9, n°8, p. 2108‑2117. Disponible sur : < http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200800560 >

Annexe

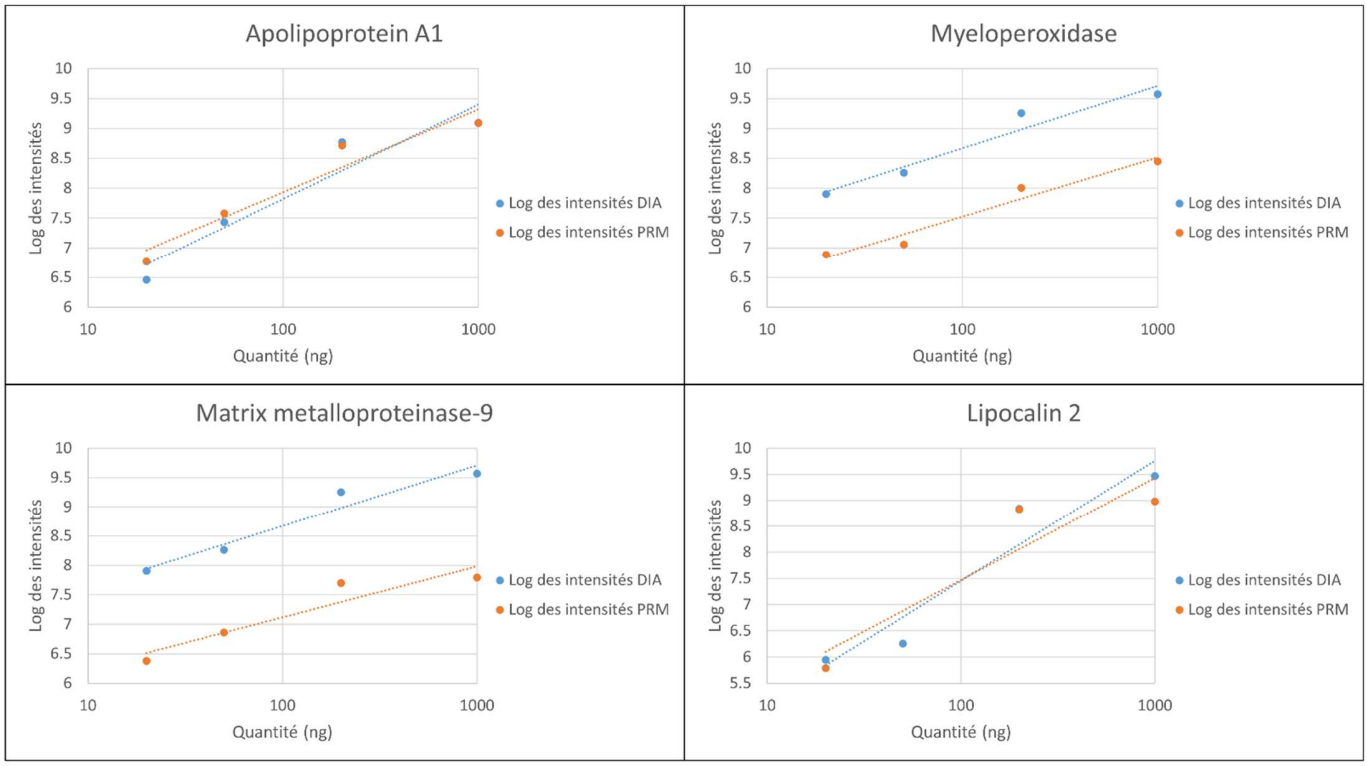


Figure 17 : Tests préliminaires de dosage en PRM (jaune) ou DIA (bleu) de peptides lourds issus de 4 protéines d'intérêts surexprimées dans les exosomes de patients cystinuriques.