

ANALYSES PROTÉOMIQUES ET PARASIToses : PRINCIPES ET APPLICATIONS

L. ALMERAS, S. BRIOLANT, E. ORLANDI-PRADINES, A. FONTAINE, M. HENRY,
H. BOGREAU, B. PRADINES, C. ROGIER, T. FUSAI

Med Trop 2007; 67 : 188-196

RÉSUMÉ • Il y a plus de 30 ans, O'Farrel décrit une méthode permettant la séparation des protéines selon deux dimensions. Cette technique a extraordinairement évolué depuis. Les avancées technologiques réalisées en parallèle en spectrométrie de masse, ainsi que les programmes de séquençages du génome de différents organismes en ont favorisé l'expansion. L'électrophorèse bi-dimensionnelle (2-D) est devenue un outil important en protéomique, permettant la séparation de milliers de protéines et aboutissant à un vision globale de l'état du protéome. Cet article présente les différentes étapes et limites d'une analyse protéomique : la préparation du matériel biologique, l'électrophorèse 2-D, les systèmes de détections protéiques, et les outils disponibles pour l'identification protéique. Des approches protéomiques alternatives à l'électrophorèse 2-D sont aussi exposées. Enfin quelques exemples d'application notamment lors d'infections parasitaires permettent de décrire les différentes possibilités des analyses protéomiques dans l'étude des mécanismes de virulence, de résistance au traitement, ou de réponse immunologique vis-à-vis d'un agent pathogène.

MOTS-CLÉS • Paludisme - Protéomique - Electrophorèse bidimensionnelle - Spectrométrie de masse - Parasitose.

PROTEOMIC ANALYSIS AND PARASITOSIS: PRINCIPLES AND APPLICATIONS

ABSTRACT • O'Farrel described a method allowing two-dimensional (2D) protein separation more than 30 years ago. Since then the original technique has made enormous progress. This progress has been accompanied by advances in mass spectrometry technology as well as various genome-sequencing programs. Today 2D electrophoresis has become the workhorse of proteomics, allowing resolution of complex structures containing thousands of proteins and providing a global view of the state of a proteome. This article presents the different steps and limitations of proteomic analysis: preparation of biological material, 2D electrophoresis, protein detection systems, and available tools for protein identification. Alternative proteomic approaches to 2D electrophoresis are also presented. A few applications are described as examples to illustrate the utility of proteomic analysis for studying the mechanisms underlying virulence, resistance to antimalarial therapies and immune response against pathologic agents.

KEY WORDS • Malaria – Proteomics – Bidimensional electrophoresis – Mass spectrometry – Parasitosis.

Abréviations : bidimensionnelle (2-D), spectrométrie de masse (SM), point isoélectrique (pI), gradient de pH immobilisés (IPG), gamme dynamique linéaire (GDL), électrospray ionisation (ESI), masse/charge (m/z), Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF), pep-

tide mass fingerprinting (PMF), electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry in tandem (ESI Q-TOF MS/MS), isotope-code affinity tag method (ICAT), surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI), multidimensional protein identification technology (MudPIT).

• *Travail de l'Unité de Recherche en Biologie et Epidémiologie Parasitaires de l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées de Marseille (L.A., Docteur es Sciences ; S.B., E.O.P., M.H., H.B., Etudiants en thèse ; A.F., Etudiant en master 2 ; B.P., Praticien confirmé de recherche en biologie et biochimie des agressions ; C.R. Praticien certifié de recherche en biologie et biochimie des agressions, chef de l'Unité de Recherche en Biologie et Epidémiologie Parasitaires ; T.F. Praticien certifié de recherche en biologie et biochimie des agressions).*

• *Correspondance : T. FUSAI, Unité de Recherche en Biologie et Epidémiologie Parasitaires, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Bd Charles Livon, BP 46, Le Pharo, 13998 Marseille Armées, France • Fax : (+33) 04 91 15 01 64.*

• *Courriel : thierry.fusai@free.fr*

• *Article sollicité.*

Les protéines représentent plus de la moitié du poids sec des cellules, et jouent un rôle majeur dans leur structure et la communication intercellulaire. Les protéines résultent de la transcription puis de la traduction des gènes aboutissant à la formation de chaînes polypeptidiques constituées d'un assortiment de 20 acides aminés. L'explosion de différents programmes de séquençages de génomes a permis de définir l'ensemble des chaînes polypeptidiques (ou protéines) susceptible d'être synthétisé par un organisme. Le fait de disposer de ce répertoire de gènes ne permet de définir ni l'identité, ni le niveau d'expression des gènes associés au type et/ou à l'environnement cellulaire. En outre, les chaînes polypeptidiques peuvent subir des modifications post-traductionnelles tels que la glycosylation ou le clivage protéolytique, modi-

fications non détectables par la seule analyse du génome ou des transcrits des gènes (transcriptome).

La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines codées par le génome (protéome) (1). Contrairement au génome, qui reste constant dans les cellules d'un même organisme et au cours de la vie d'une cellule, le protéome subit des modifications permanentes en réponse aux différentes conditions environnementales (2). Un organisme renferme donc un seul génome, mais il possède une très grande diversité de protéomes. Cette différence fondamentale entre protéome et génome nécessite des techniques pour la séparation et la quantification individuelle des protéines ainsi que leurs identifications. La protéomique offre la possibilité de caractériser le répertoire des protéines exprimées, ainsi que leurs régulations au cours de divers processus cellulaires comme la différenciation, l'infection cellulaire ou l'action d'agents pharmacologiques (3).

On distingue classiquement deux types d'analyse protéomique, d'une part l'approche systématique qui consiste à faire l'inventaire des protéines présentes à un moment donné, dans un compartiment cellulaire donné, et d'autre part l'approche pragmatique dont l'objectif est de déterminer les modifications d'expression protéique (qualitatives et quantitatives) suite à des variations environnementales (ex. stress, effets de médicaments, infection). Les deux approches sont complémentaires et permettent d'obtenir une vision globale de la physiologie de la cellule.

Cette revue décrit différentes approches techniques protéomiques classiques, en particulier l'électrophorèse bidimensionnelle (2-D), et des systèmes d'identification protéique par spectrométrie de masse (SM). Quelques exemples sont présentés pour illustrer les différents champs d'applications, notamment dans l'étude des infections parasitaires.

L'ANALYSE PROTÉOMIQUE PAR ÉLECTROPHORÈSE BI-DIMENSIONNELLE

L'analyse protéomique (Fig. 1) peut être subdivisée en 4 grandes étapes : (i) la préparation et le traitement de l'échantillon, (ii) la séparation des protéines classiquement en utilisant l'électrophorèse 2-D, (iii) la détection/coloration des protéines, et (iv) leur identification ou celle de leurs modifications post-traductionnelles par SM.

Préparation de l'échantillon

Les modalités de préparation de l'échantillon conditionnent la réussite d'une analyse protéomique. L'objectif étant l'obtention de protéines individualisées après séparation par électrophorèse 2-D pour une identification en SM, une destruction des cellules, des tissus ou organismes doit être réalisée tout en préservant l'intégrité des protéines, et leur représentativité biologique. Or les protéines cellulaires diffèrent par leur solubilité en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques. Les protéines cytoplasmiques sont généralement solubles dans l'eau, tandis que les protéines nucléaires et membranaires sont souvent extrêmement hydrophobes et insolubles en milieu aqueux (4, 5). Ces différences

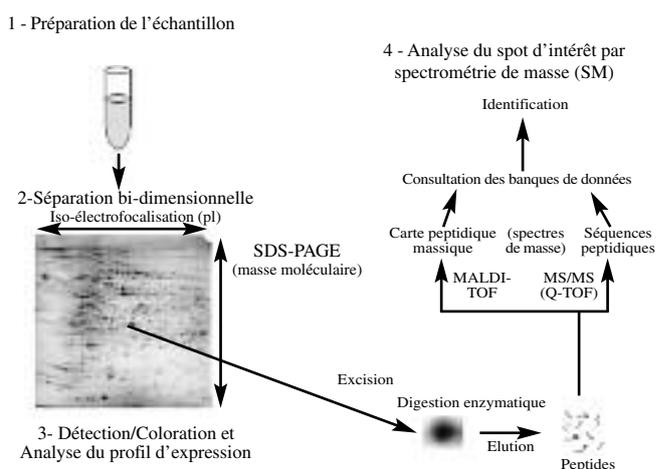


Figure 1 - Représentation schématique des différentes étapes de l'analyse protéomique par électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (SM). L'échantillon est homogénéisé avant de séparer le mélange de protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI), puis de leur masse moléculaire. Une détection des spots est réalisée par une coloration (e.g nitrate d'argent), l'analyse du gel par un logiciel dédié permet la sélection des spots d'intérêts. Ces derniers sont excisés, digérés par une enzyme (e.g trypsine), dont l'éluât est analysé par spectrométrie de masse. La confrontation des résultats obtenus par MALDI-TOF (carte peptidique massique) ou MS/MS (séquençage peptidique) avec les banques de données permet l'identification de la protéine d'intérêt et/ou de ses modifications post-traductionnelles.

de solubilité biaisent la représentativité des protéines analysées : les protéines faiblement solubles sont sous représentées en électrophorèse 2-D (6). L'absence de méthodes universelles d'extraction des protéines implique une optimisation des conditions de préparation des échantillons selon le type d'échantillon, mais également selon la question biologique posée.

La solution de solubilisation est composée généralement d'un agent chaotrope (agent biochimique désorganisant la structure protéique), d'un détergeant non ionique ou zwitterionique, d'un agent réducteur (prévient l'oxydation des groupements SH (thiol) et rompt les ponts disulfures), et d'un mélange d'ampholytes (composé chimique pouvant jouer le rôle d'un acide ou d'une base) qui facilitent la séparation des protéines lors de l'isoélectrofocalisation (séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique) (Tableau I) (7, 8). Afin de minimiser les risques de dégradation protéique lors de la préparation de l'échantillon, un mélange d'inhibiteurs de protéases est couramment inclus dans la solution de solubilisation.

Aucune préparation des échantillons ne permet à l'électrophorèse 2-D de séparer et visualiser sur un seul gel l'ensemble des protéines exprimées (9). Les biais sont principalement liés à la grande hétérogénéité des propriétés physico-chimiques des protéines issues des différents compartiments cellulaires, et à la dynamique de l'expression des protéines dans la cellule. Les différences d'expression entre les protéines les moins abondantes tels que les récepteurs

Tableau I - Réactifs couramment utilisés pour la préparation des échantillons pour l'électrophorèse 2-D

	Réactifs	Propriétés
Agents chaotropes	Urée (5-9 M) (<37°C) Urée (7M)/Thiouree (2 M)	↘ Liaisons hydrogènes ↘ Interactions hydrophobes
Détergents (1 - 4% w/v)		↘ Interactions hydrophobes Solubilisation des protéines sans modifier leur pI
Non ioniques	NP-40 Triton X100 Dodecyl maltoside	
Zwitterioniques	CHAPS / CHAPSO Sulfobetaines (SB 3-10; ASB 14) Octylglucoside	
Agents réducteurs (0.5 - 1% w/v)	Dithiothreitol (DTT) Dithioerythritol (DTE) Tributylphosphine (TBP) (2mM) Tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	Réduction des ponts disulfures (cystéines)
Carrier Ampholytes (2% v/v)	Ampholytes	↘ Précipitation ↘ Migration
Inhibiteurs de protéases	APMSF EDTA Leupeptine PMSF Bestatine	↘ Sérines protéases ↘ Métalloprotéases ↘ Sérine et thiol protéase ↘ Serine protéase ↘ aminopeptidase

↘ diminution, ↗ augmentation.

(< 100 copies par cellule) et celles exprimées à des taux importants comme les protéines de structures (10⁵ à 10⁶ copies par cellules) rendent illusoire la détection des protéines minoritaires dans un extrait cellulaire total. Enfin, le mélange extrêmement complexe de protéines présentes dans une cellule de mammifère (environ 100 000 protéines différentes) (9), est incompatible avec le nombre de protéines distinguables sur un gel 2-D (généralement 2 000 protéines, et pouvant atteindre dans certains cas 5000 protéines) (7).

Pour pallier ces limites, l'analyse de sous-protéomes permet de diminuer la complexité protéique d'un échantillon ou d'enrichir les formes protéiques minoritaires (9-11). Les techniques les plus couramment utilisées sont : (i) l'isolement de compartiments ou d'organelles cellulaires par centrifugations successives avec ou sans gradients de densité, (ii) le fractionnement de l'échantillon à l'aide de colonnes de chromatographie, (iii) l'isolement d'un groupe de cellules spécifiques par cytométrie de flux, (iv) la microdissection d'un tissu à l'aide d'un laser (12). Un exemple de réalisation de sous-protéomes de gels 2-D (fraction membranaire et fraction cytoplasmique) par rapport au même échantillon non fractionné d'une lignée cellulaire humaine est illustré sur la figure 2A.

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-D)

L'électrophorèse 2-D sépare d'abord les protéines selon leur point isoélectrique (pI), puis selon leur masse moléculaire. Les protéines sont des composés amphotères, c'est à dire chargés positivement et négativement. Le pI d'une pro-

téine correspond au pH pour lequel les charges positives compensent les charges négatives.

La première description de la séparation de protéines dans une première dimension selon leur pI, et dans une seconde dimension selon leur masse moléculaire remonte au milieu des années 70 par O'Farrell (13). Cette technique a révolutionné l'analyse des protéines puisqu'elle permet de séparer un nombre important de protéines (forte résolution) tout en bénéficiant d'une bonne sensibilité (quantification des protéines). Cependant, la séparation sur la première dimension posait des problèmes de reproductibilité rendant difficile la comparaison de résultats entre laboratoires (7).

L'introduction des gradients de pH immobilisés (IPG) au début des années 80, a permis de résoudre ces problèmes de reproductibilité (14). Ces IPGs se présentent sous la forme de bandelettes d'acrylamide contenant des immobilines déshydratées pré-coulées sur un film plastique de 3-4 mm de large et de 7 à 24 cm de long. Les gradients peuvent couvrir de larges gammes de pH (ex. pH 3 à 10) ou des gradients de pH étroits (1 unité de pH ou moins) conférant une résolution élevée (15, 16). Des protéines de masses moléculaires proches ou identiques, parfaitement indistinguables en électrophorèse SDS-PAGE (une dimension, 1D), peuvent être séparés en fonction de leur pI. Ces propriétés font de l'électrophorèse 2-D, la technique de choix pour l'étude des modifications post-traductionnelles (17, 18). Les IPGs prêtes à l'emploi ont «démocratisé» les analyses protéomiques, aboutissant à une simplification de manipulation, et à une reproductibilité accrue inter-gels permettant

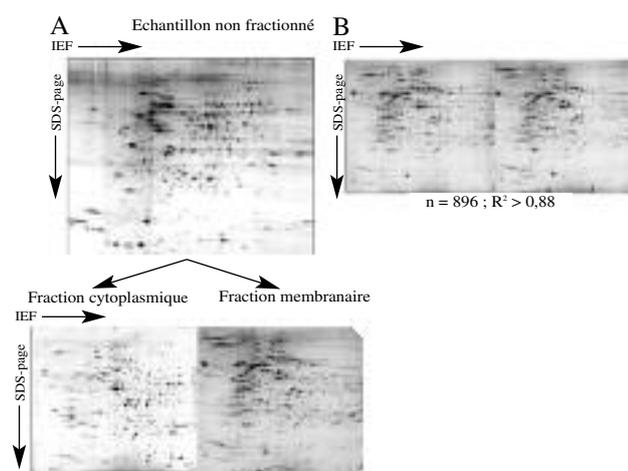


Figure 2 - Gel bidimensionnel de lignées cellulaires humaines en cultures. (A) Modification du profil protéique selon que l'on s'intéresse à l'ensemble des protéines cellulaires (en haut), ou à ses sous-protéomes membranaires ou cytoplasmiques (en bas). Détection d'un nombre plus important (non détectable sur la fraction totale) de spots protéiques grâce au fractionnement cellulaire. (B) Comparaison de deux électrophorèses 2-D réalisées à partir de culture de la même lignée cellulaire à 1 semaine d'intervalle dans les mêmes conditions. L'analyse à l'aide d'un logiciel dédié (PDQuest 7.2, Biorad), permet d'évaluer la reproductibilité entre ces deux gels (R : coefficient de corrélation ; n : nombre de spots pris en compte pour l'analyse).

une standardisation des protocoles entre laboratoires et des analyses comparatives (Fig. 2B).

Malgré ces développements techniques, les protéines de $pI < 3$ ou > 9 , et/ou de masses moléculaires < 10 kDa ou > 150 kDa, ne sont généralement pas détectables en gels 2-D classiques (19). Or, les prédictions bioinformatiques des cartes protéomiques faites à partir de l'analyse des séquences des gènes estiment que jusqu'à 20% des protéines exprimées dans un organisme possèderaient un pI supérieur à 10 (20). Des stratégies ont été développées par différentes équipes pour élargir la fenêtre d'analyse en pI (21-23), sans pour autant permettre la détection de l'ensemble des protéines de pI extrêmes. Inversement, quelques modifications mineures de la seconde dimension, comme l'augmentation de la réticulation du gel, et le changement d'un tampon de migration permettent de mieux séparer les protéines de faibles masses moléculaires (jusqu'à 1 kDa) (24). Pour les protéines de hauts poids moléculaires, le problème est différent car il ne provient pas de la séparation en SDS-PAGE, mais principalement des tampons de solubilisation des échantillons. Ces derniers, ayant des forces ioniques faibles et utilisant des détergents non chargés, rendent particulièrement difficiles l'extraction et le maintien en solution de ces protéines. Les protéines à plusieurs domaines transmembranaires cumulent souvent ces différents facteurs limitant leur analyse (masse moléculaire élevée, $pI > 9$, solubilité faible et nombre de copies par cellule peu important) (25).

Des stratégies alternatives à l'électrophorèse 2-D, s'affranchissant partiellement de certaines de ces limitations technologiques sont présentées dans la partie consacrée aux nouvelles approches d'analyse protéomique.

Détection/Coloration et systèmes d'analyses de gels 2-D

Plusieurs méthodes existent pour la détection des protéines après une électrophorèse 2-D (26, 27). Les plus couramment utilisées sont basées sur l'emploi de colorants (bleu de Coomassie R-250 ou G-250), de métaux lourds (nitrate d'argent), de radioéléments (3H , ^{14}C , ^{35}S , ou ^{32}P), ou de sondes fluorescentes (SYPRO Ruby, SYPRO Orange, Deep purple, etc...). Ces méthodes de détection diffèrent en termes de sensibilité, de gamme dynamique linéaire (GDL) (ratio d'intensité sur lequel on peut faire une quantification linéaire), de coût, et surtout de compatibilité avec la SM (28). Un résumé des propriétés de ces principales méthodes de détection est présenté dans le tableau II. Ces méthodes colorent l'ensemble des protéines présentes sur un gel 2-D correspondant à des systèmes de détection universelle.

D'autres méthodes détectent uniquement une partie du protéome présent sur le gel 2-D correspondant à des systèmes de détection spécifique. Par exemple, des systèmes de détection spécifique fluorescente ont été développés pour l'analyse des modifications post-traductionnelles (29, 30). La caractérisation des modifications post-traductionnelles est un des enjeux majeurs pour la compréhension de nombreux mécanismes de régulation cellulaire. L'étude de l'ensemble des protéines phosphorylées ou glycosylées est par conséquent en plein essor, et l'on parle respectivement d'analyses du phosphoprotéome et du glycoprotéome (18, 31). Récemment, des systèmes de détection spécifique fluorescente ont été développés pour l'analyse du phosphoprotéome et du glycoprotéome par l'utilisation respectivement du Pro-Q Diamod et du Pro-Q Emerald (29, 30). L'immunoprotéomique est une autre façon de détecter spécifiquement des protéines antigéniques transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées à l'aide d'anticorps. Ce type d'approche peut permettre la caractérisation de marqueurs physiopathologiques ou d'évolution d'une pathologie (32).

L'idéal est de disposer d'une technique de détection la plus sensible et la plus linéaire possible, permettant à la fois de consommer le moins d'échantillon biologique possible et de pouvoir réaliser une analyse quantitative aussi précise que possible. En pratique, il s'agit de choisir le meilleur compromis pour l'objectif fixé.

Ces analyses qualitatives et quantitatives sont réalisées à l'aide de logiciels dédiés à l'étude comparative des gels 2-D. Plusieurs logiciels sont disponibles et la comparaison de leurs capacités analytiques a fait l'objet de quelques publications (33-35). Brièvement, les logiciels réalisent successivement à partir des images numérisées, une détection automatique des spots protéiques, leur quantification puis une comparaison des profils protéiques des gels 2-D dans des conditions identiques (tests de reproductibilité, figure 2B), et entre différentes conditions expérimentales (protéines associées aux modifications environnementales). Ces logiciels réalisent des analyses quantitatives

Tableau II - Propriétés des méthodes courantes de détection des protéines sur gel 2-D :

Type de marquage	Sensibilité	Gamme dynamique linéaire (GLD)	Système de détection	Compatibilité avec la SM	Durée / nombre d'étapes	Coût	Références
Bleu de Coomassie R-250	10-25 ng	10 ²	Scanner densitométrique	++++	2,5 h/2	+	(65)
Bleu de Coomassie G-250	5-10 ng	10 ²	Scanner densitométrique	++++	2,5 h/5	+	(65)
Nitrate d'argent	0,5-1 ng	< 10 ²	Scanner densitométrique	++*	3h/7	++	(36, 66, 67)
Méthionine ³⁵ S	0,1 ng	> 10 ³	Film autoradiographique, phosphor imager	++++**	Variable# / 3	+++	(68-70)
SYPRO Ruby	0,5-1 ng	> 10 ³	UV-transilluminateur, caméra CCD, scanner laser	+++	3h / 2	++++	(26, 71-73)

* Uniquement en l'absence de glutaraldéhyde, son utilisation lors de la coloration rend le système complètement incompatible avec la SM.

** Rarement utilisé en SM dû à la présence de radioactivité.

De quelques heures à plusieurs jours.

+ : faible, ++ : intermédiaire, +++ : élevé, ++++ : très élevé.

SM : spectrométrie de masse.

précises (de l'ordre de ± 10%, figure 2B), ce qui permet de considérer des variations faibles de quantités de protéines (de l'ordre d'un facteur 2) comme statistiquement significatives (p<0.05). Les spots protéiques retenus par l'analyse statistique sont généralement sélectionnés pour être identifiés par SM.

Spectrométrie de masse (SM)

L'ultime étape de l'analyse protéomique est l'identification des spots protéiques d'intérêt et/ou de leurs modifications post-traductionnelles. Cette identification protéique a longtemps été réalisée par le microséquençage chimique

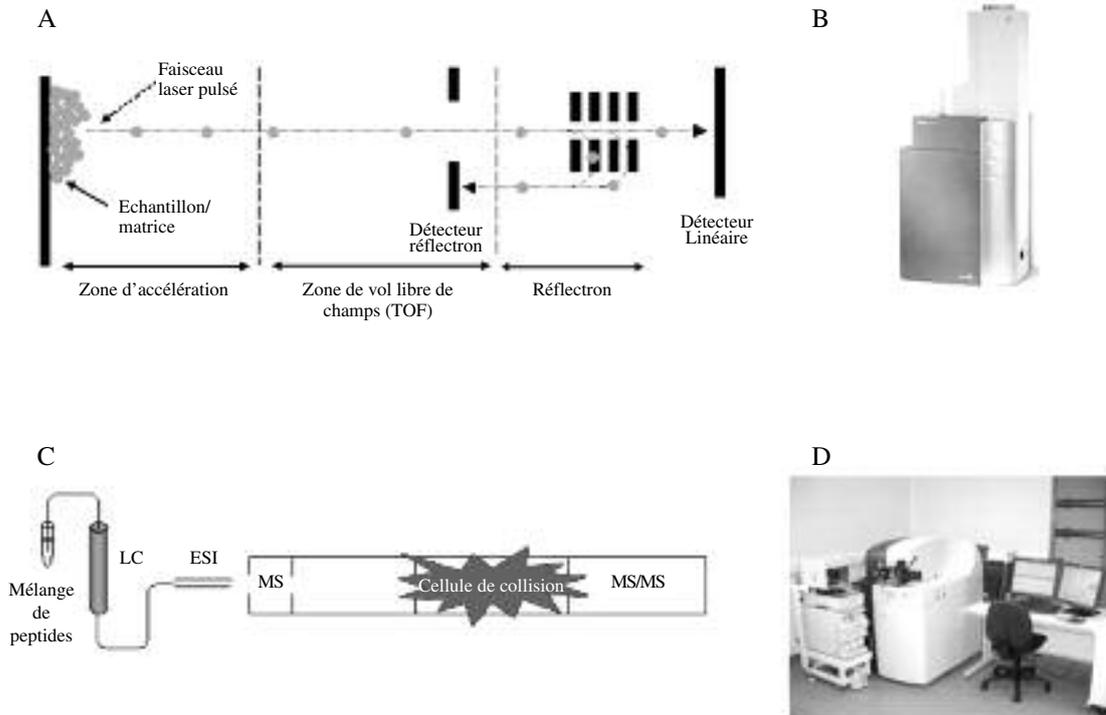


Figure 3 - Spectromètres de masse : MALDI-TOF et Q-TOF. (A) Représentation schématique d'un MALDI-TOF. L'échantillon peptidique ionisé par le laser est accéléré puis séparé dans la zone libre de champs avant d'atteindre le détecteur. Ce dernier couplé à l'enregistreur permet d'obtenir une carte peptidique massive spécifique du composé. (B) Photographie de l'Etan pro MALDI-TOF de chez Amersham biosciences disponible sur la plate-forme protéomique de la Faculté de Pharmacie de Marseille. (C) Représentation schématique d'un Q-TOF. Les peptides sont injectés par électrospray ionisation (ESI) dans le spectromètre de masse après leur séparation par chromatographie liquide (LC). Les peptides entrent dans un premier spectre de masse (MS) sélectionnant les peptides qui seront séquençés dans le second SM (MS/MS) après avoir été fragmentés dans la cellule de collision. (D) Photographie d'un Q-TOF de chez Micromass disponible au Centre d'Analyse Protéomique de Marseille (CAPM) situé au niveau de la Faculté de Médecine Nord de Marseille.

(chimie récurrente d'Edman). Aujourd'hui, les techniques de SM, beaucoup plus sensibles et rapides, ont remplacé cette approche. Préalablement à l'analyse par SM, les spots protéiques d'intérêt, sont excisés du gel, soumis à une digestion par une protéase (généralement de la trypsine), précédant l'éluion des peptides générés (Fig. 1). Selon le type de coloration utilisée et l'appareil de SM choisi pour l'identification de la protéine, la méthode de préparation de l'échantillon varie sensiblement (36).

Un SM est un appareil qui permet de mesurer le rapport masse/charge (m/z) des ions formés à partir de l'échantillon à analyser. Il est généralement constitué des parties suivantes : (i) une source d'ions dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse (vaporisation/ sublimation/désorption) et l'ionisation des molécules à analyser (source MALDI ou ESI), (ii) un analyseur qui sépare les ions selon leur rapport masse/charge (ex. TOF, quadripôle), (iii) un détecteur qui donne l'intensité des ions en leur associant leur rapport m/z , (iv) et un enregistreur pour le traitement du signal et la visualisation des spectres.

Il existe plusieurs types de spectromètres de masse utilisables pour l'identification protéique. Cette partie présente les principes généraux de deux appareils : le MALDI-TOF et l'ESI-Q-TOF MS/MS.

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight)

Dans le MALDI, l'échantillon est mélangé avec une matrice (ex. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, (37)) favorisant la désorption et l'ionisation des peptides. Le MALDI-TOF peut fonctionner soit en mode linéaire soit en mode réflectron. Un aperçu du fonctionnement de l'appareil est illustré sur la figure 3A. Brièvement, un faisceau laser pulsé ionise l'échantillon. Ce dernier est accéléré vers l'analyseur par l'application d'un champ électrique. Dans la seconde zone se trouve un tube de vol (TOF pour Time-Of-Flight) libre de champs, où les ions se séparent en fonction de la vitesse acquise dans la zone d'accélération jusqu'à atteindre le détecteur. Ce dernier couplé à l'enregistreur permet d'obtenir un spectre (carte peptidique massique) de la distribution des masses des fragments peptidiques obtenus par la digestion trypsique. La trypsine coupe les protéines après les résidus lysine ou arginine. Les cartes peptidiques massiques sont spécifiques de chaque protéine, et constituent une véritable empreinte digitale d'où le nom de «peptide mass fingerprinting» (PMF) (38, 39). L'identification de la protéine s'effectue en comparant la carte peptidique massique obtenue expérimentalement avec celles résultant du clivage théorique de l'ensemble des protéines dont la séquence est connue dans les banques de données (ex. SwissProt, TrEmbl, MSDB). Plusieurs programmes d'analyse de carte peptidique massique sont disponibles sur internet pour cette identification (Mascot : <http://www.matrixscience.com>, ProFound : http://bioinformatics.genomicsolutions.com/prowl/profound/profound_E_adv.html) (40, 41). Si l'information requise pour l'identification de la protéine est absente de la banque de données (ex. séquençage incomplet du génome), ou si l'échantillon à analyser est composé d'un mélange de protéines (ex.

une bande protéique d'un gel SDS-PAGE), les identifications ne peuvent pas être effectuées par cette méthode. On préférera alors utiliser un spectromètre de masse en mode tandem de type Q-TOF.

Le MALDI-TOF, généralement dédié à l'identification de protéines séparées par gel 2-D, présente de nombreux avantages : il allie la sensibilité (500 femtomoles), (42) à la rapidité d'analyse (quelques minutes par analyse), et peut être automatisé permettant des analyses à hauts débits (> 1000 échantillons par jour) (43).

ESI Q-TOF MS/MS (electrospray ionization quadripole time-of-flight mass spectrometry in tandem)

Le séquençage peptidique par SM en tandem est basé sur le clivage des liaisons entre les résidus d'acides aminés. Un aperçu du fonctionnement de l'appareil est illustré sur la figure 3C. L'electrospray ionisation nécessite la génération d'ions peptidiques à partir d'une solution aqueuse (44). Le mélange peptidique en solution est séparé sur une colonne de chromatographie avant de passer au travers d'une aiguille soumise à un très haut voltage, puis le solvant est éliminé par un gaz inerte ou chauffage. Les ions formés entrent dans le premier analyseur. Parmi ces ions, un ion précurseur est sélectionné, et seuls les ions ayant un rapport m/z sélectionné entrent dans une zone libre de champs, où est placée une cellule de collision. A ce niveau, les ions précurseurs entrent en collision avec des molécules de gaz (e.g argon), qui provoque leur fragmentation. Les fragments pénètrent dans un second analyseur permettant d'obtenir des informations sur la séquence ou les modifications post-traductionnelles de la protéine. L'identification est obtenue par l'utilisation de banques de données protéiques et génomiques corrélée avec les données obtenues du spectre de masse (ex. Mascot). En biologie, ce type d'expérience est notamment utilisé pour déterminer la séquence de peptides, ou pour rechercher des modifications ou des mutations. Les analyses en *electrospray* avec la configuration Q-TOF (Quadripole-time-of-flight) correspondent à la configuration MS/MS classique. Le premier analyseur est un quadripôle (Q), et le second est un temps de vol (TOF).

NOUVELLES APPROCHES D'ANALYSE PROTÉOMIQUE

L'objectif de ces nouvelles approches est de réaliser des analyses protéomiques à haut débit et haute sensibilité à partir de mélanges plus ou moins complexes de protéines, en s'exonérant de la réalisation de gels 2-D.

Dans cette optique, Washburn et ses collaborateurs (45) ont développé une technique fondée sur la séparation des protéines par chromatographie à deux dimensions (deux colonnes en série avec des phases différentes) couplée directement à un appareil de spectrométrie de masse. Dans cette approche, un échantillon complexe est digéré par une enzyme, puis séparé par chromatographie liquide (généralement utilisation de colonnes à phase inverse puis échan-

geuses d'ions, en série) pour réduire la complexité du mélange de peptides délivrés simultanément au SM. Les peptides séparés selon leur rapport m/z sont séquencés et les informations de séquence sont utilisées pour rechercher l'identité de la protéine dans les banques de données. Cette technique présente l'avantage de pouvoir identifier un nombre important de protéines en une seule analyse, mais également des protéines de masse moléculaire et de pI extrêmes ainsi que des protéines membranaires (45, 46). Cette technique fut nommée MudPIT pour *multidimensional protein identification technology*. Malgré ses performances impressionnantes, la technique MudPIT ne détecte qu'une partie des protéines visualisées par l'approche classique d'électrophorèse 2-D couplé à la SM (47). De plus, cette technique ne permet pas d'évaluer les quantités relatives des différentes protéines.

Afin de comparer les quantités relatives de protéines, une approche basée sur l'utilisation d'isotopes stables fut développée (nommée ICAT pour *isotope-code affinity tag method*) (48). Cette technique est utilisable pour l'étude quantitative des protéines membranaires (49).

Enfin, Hutchens et Yip (50) ont développé un système composé de différentes matrices de puce, qui exploite les caractéristiques biophysiques et chromatographiques des différentes protéines pour leur sélection préférentielle. Cette technique manufacturée par Ciphergen (Fremont, Californie, USA) nommée SELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization), ne nécessite aucune digestion enzymatique préalable de l'échantillon, et est principalement utilisée pour des comparaisons de profils d'expression protéique (51). Brièvement, le principe consiste à déposer un échantillon complexe sur un support chromatographique (puce), puis à l'éluer partiellement pour en réduire la complexité. Les protéines fixées sont alors analysées dans un SM. Sa principale limite est l'obtention uniquement de la masse moléculaire de la protéine, aucune information sur son identité n'est disponible. Cette technique est généralement utilisée pour la recherche de biomarqueurs (52).

APPLICATIONS

Pour compléter cette revue, quelques exemples d'utilisation de l'outil protéomique appliqués à l'étude des infections parasitaires sont présentés. Jusqu'à récemment, les études protéomiques parasitaires étaient limitées par l'absence du séquençage de leur génome. Les programmes de séquençage génomique de nombreux parasites, tel que le protozoaire *Leishmania major* ou *Plasmodium falciparum* rendent de telles études réalisables (53). Il est ainsi possible par une approche protéomique de s'intéresser aux effets d'agents pharmacologiques et le cas échéant aux mécanismes de résistance du parasite, mais également de définir des marqueurs immunologiques induits par l'infection parasitaire pouvant servir à terme au développement de tests diagnostiques ou de cibles thérapeutiques ou vaccinales.

La leishmaniose est une pathologie induite par un parasite protozoaire du genre *Leishmania* dont l'évolution clinique peut être fatale, notamment dans les formes viscérales

(54). Bien que des traitements existent, des phénomènes de résistance sont couramment décrits (55). Une comparaison quantitative du protéome d'une souche de *L. major* sensible vs. résistante au traitement par des antifolates (méthotrexate), a permis à Drummel-Smith et Coll (56) d'identifier une nouvelle cible de ce médicament (la ptéridine réductase PTR1). Une mutation du gène *ptr1* induit une surexpression de la protéine responsable du phénomène de résistance. L'intérêt d'une telle identification permet d'envisager le dépistage des souches résistantes et le développement d'agents pharmacologiques plus efficaces.

Les études protéomiques sont particulièrement intéressantes dans l'étude de corrélations entre protéome et phénotype parasitaire comme par exemple la virulence. Il a été décrit des infections par *Entamoeba histolytica* chez des sujets ne présentant aucun signe de colite amibienne ou d'amibiase hépatique (57, 58). Des analyses comparatives par gels 2-D, du protéome de deux souches d'*Entamoeba histolytica* différant par leur virulence, ont été réalisées par Davis et Coll, (59). Cette étude associe la virulence parasitaire à la dérégulation de l'expression de six protéines, dont deux d'entre elles présentent des propriétés anti-oxydantes. Ce type d'approche permet ainsi d'identifier des marqueurs biologiques de virulence d'infections parasitaires.

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est responsable du décès de millions de personnes chaque année (60). En l'absence de vaccins efficaces, la chimiothérapie reste le principal moyen de contrôle de la maladie. Cependant, l'apparition de résistances vis-à-vis des traitements anti-paludiques nécessite le développement de nouvelles molécules ou combinaisons de molécules anti-paludiques (61). Récemment, une équipe anglaise (62) s'est intéressée à déterminer les cibles d'un nouveau médicament, le CoArtem (association d'un dérivé de l'artémisinine et de la luméfantrine). Dans cette optique, ils ont comparé les protéomes de *P. falciparum* traité par l'un ou l'autre des anti-paludiques contenus dans le CoArtem. Ils ont pu mettre en évidence une action antagoniste de ces molécules sur les enzymes de la glycolyse (métabolisme énergétique) du parasite, mais une action similaire sur plusieurs protéines de choc thermique. Ce travail a disséqué quelques uns des effets de ces molécules sur le protéome de *P. falciparum* permettant une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action.

La protéomique peut également être utilisée pour l'identification de protéines d'agents infectieux pouvant induire une réponse immunitaire. *Chlamydia trachomatis* est une bactérie sexuellement transmissible dont le site d'infection privilégié est le tractus urogénital (63). Afin d'identifier des protéines antigéniques de *Chlamydia trachomatis*, Sanchez-Campillo et Coll, ont analysé les profils de réactivité immunologique par Western blot 2-D, de sujets infectés par cette bactérie (64). Malgré une hétérogénéité de reconnaissance antigénique entre les patients, cette approche immuno-protéomique, leur a permis d'identifier une protéine antigénique commune (outer membrane protein-2, OMP2) qui pourrait servir de marqueur biologique d'infection pour le développement de tests diagnostics. Les auteurs évoquent également que certaines des protéines antigéniques identifiées

(les protéines ribosomales L7/L12 et la protéase induite par le stress HtrA) pourraient être des cibles de choix pour des stratégies vaccinales.

CONCLUSION

Les nombreux progrès technologiques réalisés ces 20 dernières années, aussi bien dans la préparation et l'analyse de gels bidimensionnels de protéines, que dans les analyses par SM ont favorisé l'émergence de la protéomique. Malgré les limitations de l'électrophorèse 2-D évoquées précédemment, cette technique est capable de séparer simultanément un mélange complexe de protéines, permet des analyses comparatives qualitatives et quantitatives d'expressions protéiques, et permet l'étude de leurs modifications post-traductionnelles. L'ensemble de ces propriétés fait de l'électrophorèse 2-D un outil de choix toujours compétitif pour l'analyse de protéomes.

L'explosion des programmes de séquençages des génomes de nombreux organismes, notamment ceux de parasites et de leurs vecteurs, a permis d'envisager le développement d'approches protéomiques lors d'infections parasitaires. Comme cela est présenté ci-dessus, l'analyse protéomique peut être utilisée dans de très nombreux domaines, tant au niveau d'études fondamentales qu'au niveau d'études appliquées.

RÉFÉRENCES

- 1 - WILKINS MR, SANCHEZ JC, GOOLEY AA *et Coll* - Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996; **13** : 19-50.
- 2 - HOFFROGGE R, BEYER S, VOLKER U *et Coll* - 2-DE proteomic profiling of neuronal stem cells. *Neurodegener Dis* 2006; **3** : 112-21.
- 3 - SALONEN JM, VALMU L, RONNHOLM G *et Coll* - Proteome analysis of B-cell maturation. *Proteomics* 2006; **6** : 5152-68.
- 4 - DE MARQUI AB, VIDOTTO A, POLACHINI GM *et Coll* - Solubilization of proteins from human lymph node tissue and two-dimensional gel storage. *J Biochem Mol Biol* 2006; **39** : 216-22.
- 5 - STANLEY BA, NEVEROVA I, BROWN HA, VAN EYK JE - Optimizing protein solubility for two-dimensional gel electrophoresis analysis of human myocardium. *Proteomics* 2003; **3** : 815-820.
- 6 - AHRAM M, SPRINGER DL - Large-scale proteomic analysis of membrane proteins. *Expert Rev Proteomics* 2004; **1** : 293-302.
- 7 - GORG A, WEISS W, DUNN MJ - Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; **4** : 3665-85.
- 8 - GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G *et Coll* - The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; **21** : 1037-53.
- 9 - STASYK T, HUBER LA - Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* 2004; **4** : 3704-16.
- 10 - SHAW MM, RIEDERER BM - Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2003; **3** : 1408-17.
- 11 - CORDWELL SJ, NOUWENS AS, VERRILLS NM, BASSEAL DJ, WALSH BJ - Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* 2000; **21** : 1094-103.
- 12 - MCGREGOR E, DE SOUZA A - Proteomics and laser microdissection. *Methods Mol Biol* 2006; **333** : 291-304.
- 13 - O'FARRELL PH - High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; **250** : 4007-21.
- 14 - BJELLQVIST B, EK K, RIGHETTI PG *et Coll* - Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982; **6** : 317-39.
- 15 - GORG A, POSTEL W, GUNTHER S - The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988; **9** : 531-46.
- 16 - GORG A, POSTEL W, WESER J *et Coll* - Improved resolution of PI (alpha 1-antitrypsin) phenotypes by a large-scale immobilized pH gradient. *Am J Hum Genet* 1985; **37** : 922-30.
- 17 - COULONVAL K, BOCKSTAELE L, PATERNOT S, ROGER PP - Phosphorylations of cyclin-dependent kinase 2 revisited using two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 2003; **278** : 52052-60.
- 18 - KAUFMANN H, BAILEY JE, FUSSENEGGER M - Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2001; **1** : 194-9.
- 19 - CHEN P, LI X, SUN Y, LIU Z, CAO R, HE Q *et Coll* - Proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane: characterization of potential neuronal-specific plasma membrane proteins. *J Neurochem* 2006; **98** : 1126-40.
- 20 - VANBOGELEN RA, SCHILLER EE, THOMAS JD, NEIDHARDT FC - Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis* 1999; **20** : 2149-59.
- 21 - GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, WEISS W - Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 1999; **20** : 712-7.
- 22 - WASINGER VC, BJELLQVIST B, HUMPHERY-SMITH I - Proteomic 'contigs' of *Chrobacterium anthropi*, application of extensive pH gradients. *Electrophoresis* 1997; **18** : 1373-83.
- 23 - CORDWELL SJ, BASSEAL DJ, BJELLQVIST B, SHAW DC, HUMPHERY-SMITH I - Characterisation of basic proteins from *Spiroplasma melliferum* using novel immobilised pH gradients. *Electrophoresis* 1997; **18** : 1393-8.
- 24 - SCHAGGER H, VON JAGOW G - Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; **166** : 368-79.
- 25 - ARTHUR JM - Proteomics. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; **12** : 423-30.
- 26 - PATTON WF - Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; **771** : 3-31.
- 27 - RABILLOUD T - Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal Chem* 2000; **72** : 48A-55A.
- 28 - WHEELLOCK AM, MORIN D, BARTOSIEWICZ M, BUCKPITT AR - Use of a fluorescent internal protein standard to achieve quantitative two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2006; **6** : 1385-98.
- 29 - STEINBERG TH, AGNEW BJ, GEE KR *et Coll* - Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. *Proteomics* 2003; **3** : 1128-44.
- 30 - HART C, SCHULENBERG B, STEINBERG TH *et Coll* - Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using Pro-Q Emerald 488 dye, a fluorescent periodate Schiff-base stain. *Electrophoresis* 2003; **24** : 588-98.
- 31 - BALEN B, KRŠNIK-RASOL M, ZAMFIR AD *et Coll* - Glycoproteomic survey of *Mammillaria gracilis* tissues grown *in vitro*. *J Proteome Res* 2006; **5** : 1658-66.
- 32 - ALMERAS L, LEFRANC D, DROBECQ H *et Coll* - New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. *Proteomics* 2004; **4** : 2184-94.
- 33 - MARENGO E, ROBOTTI E, ANTONUCCI F *et Coll* - Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: a review of commercial software and home-made systems. *Proteomics* 2005; **5** : 654-66.

- 34 - RAMAN B, CHEUNG A, MARTEN MR - Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis software packages, Z3 and Melanie. *Electrophoresis* 2002; **23** : 2194-02.
- 35 - ROSENGREN AT, SALMI JM, AITOKALLIO T *et Coll* - Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. *Proteomics* 2003; **3** : 1936-1946.
- 36 - GHARAHDAAGHI F, WEINBERG CR, MEAGHER DA *et Coll* - Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 1999; **20** : 601-5.
- 37 - SMIRNOV IP, ZHU X, TAYLOR T *et Coll* - Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2004; **76** : 2958-65.
- 38 - HENZEL WJ, BILLECI TM, STULTS JT *et Coll* - Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90** : 5011-5.
- 39 - WISE MJ, LITTLEJOHN TG, HUMPHERY-SMITH I - Peptide-mass fingerprinting and the ideal covering set for protein characterisation. *Electrophoresis* 1997; **18** : 1399-409.
- 40 - WILKINS MR, GASTEIGER E, WHEELER CH *et Coll* - Multiple parameter cross-species protein identification using MultitIdent—a world-wide web accessible tool. *Electrophoresis* 1998; **19** : 3199-206.
- 41 - ZHANG W, CHAIT BT - ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem* 2000; **72** : 2482-9.
- 42 - BLACKSTOCK WP, WEIR MP - *Proteomics*: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999; **17** : 121-7.
- 43 - STENSALLE A, JENSEN ON - Simplified sample preparation method for protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: in-gel digestion on the probe surface. *Proteomics* 2001; **1** : 955-66.
- 44 - FENN JB, MANN M, MENG CK, WONG SF, WHITEHOUSE CM - Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; **246** : 64-71.
- 45 - WASHBURN MP, WOLTERS D, YATES JR, 3RD - Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001; **19** : 242-7.
- 46 - VANROBAEYS F, VAN COSTER R, DHONDT G *et Coll* - Profiling of myelin proteins by 2-D -gel electrophoresis and multidimensional liquid chromatography coupled to MALDI TOF-TOF mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; **4** : 2283-93.
- 47 - KOLLER A, WASHBURN MP, LANGE BM *et Coll* - Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99** : 11969-74. Epub 12002 Aug 11965.
- 48 - GYGI SP, RIST B, GERBER SA *et Coll* - Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999; **17** : 994-9.
- 49 - CHENG D, HOOGENRAAD CC, RUSH J *et Coll* - Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol Cell Proteomics* 2006; **5** : 1158-70.
- 50 - HUTCHENS TW, YIP, T.-T. - New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 1993; **7** : 576-80.
- 51 - MERCHANT M, WEINBERGER SR - Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; **21** : 1164-77.
- 52 - DARE TO, DAVIES HA, TURTON JA *et Coll* - Application of surface-enhanced laser desorption/ionization technology to the detection and identification of urinary parvalbumin-alpha: a biomarker of compound-induced skeletal muscle toxicity in the rat. *Electrophoresis* 2002; **23** : 3241-51.
- 53 - ERSFELD K - Genomes and genome projects of protozoan parasites. *Curr Issues Mol Biol* 2003; **5** : 61-74.
- 54 - HERWALD BL - Leishmaniasis. *Lancet* 1999; **354** : 1191-9.
- 55 - SUNDAR S - Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001; **6** : 849-54.
- 56 - DRUMMELSMITH J, BROCHU V, GIRARD I *et Coll* - Proteome mapping of the protozoan parasite Leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics* 2003; **2** : 146-55.
- 57 - DIAMOND LS, HARLOW DR, CUNNICK CC - A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; **72** : 431-2.
- 58 - MATTERN CF, KEISTER DB, CASPAR PA - Experimental amebiasis. III. A rapid *in vitro* assay for virulence of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1978; **27** : 882-7.
- 59 - DAVIS PH, ZHANG X, GUO J, TOWNSEND RR, STANLEY SL, JR. - Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol* 2006; **61** : 1523-32.
- 60 - SNOW RW, CRAIG M, DEICHMANN U, MARSH K - Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ* 1999; **77** : 624-40.
- 61 - BIAGINI GA, O'NEILL PM, NZILA A *et Coll* - Antimalarial chemotherapy: young guns or back to the future? *Trends Parasitol* 2003; **19** : 479-87.
- 62 - MAKANGA M, BRAY PG, HORROCKS P, WARD SA - Towards a proteomic definition of CoArtem action in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proteomics* 2005; **5** : 1849-58.
- 63 - MILLER KE - Diagnosis and treatment of *Chlamydia trachomatis* infection. *Am Fam Physician* 2006; **73** : 1411-6.
- 64 - SANCHEZ-CAMPILLO M, BINI L, COMANDUCCI M *et Coll* - Identification of immunoreactive proteins of *Chlamydia trachomatis* by Western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera. *Electrophoresis* 1999; **20** : 2269-79.
- 65 - NEUHOFF V, AROLD N, TAUBE D, EHRHARDT W - Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988; **9** : 255-62.
- 66 - SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, MANN M - Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; **68** : 850-8.
- 67 - YAN JX, WAIT R, BERKELMAN T, HARRY RA, WESTBROOK JA, WHEELER CH *et Coll* - A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; **21** : 3666-72.
- 68 - GARRELS JI - The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. *J Biol Chem* 1989; **264** : 5269-82.
- 69 - LINK AJ - Autoradiography of 2-D gels. *Methods Mol Biol* 1999; **112** : 285-90.
- 70 - PATTERSON SD, LATTER GI - Evaluation of storage phosphor imaging for quantitative analysis of 2-D gels using the Quest II system. *Biotechniques* 1993; **15** : 1076-83.
- 71 - BERGGREN K, CHERNOKALSKAYA E, STEINBERG TH *et Coll* - Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 2000; **21** : 2509-21.
- 72 - LAMANDA A, ZAHN A, RÖDER D, LANGEN H - Improved Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics* 2004; **4** : 599-608.
- 73 - RABILLOUD T, STRUB JM, LUCHE S *et Coll* - A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 2001; **1** : 699-704.