



**HAL**  
open science

## Analyses multiples des protéines : multiplexages en phase solide (puces à protéines) ou liquide; applications en biologie médicales et perspectives

Sylvain Lehmann, Stéphane Roche, Anne-Marie Dupuy

### ► To cite this version:

Sylvain Lehmann, Stéphane Roche, Anne-Marie Dupuy. Analyses multiples des protéines : multiplexages en phase solide (puces à protéines) ou liquide; applications en biologie médicales et perspectives. Protéomique, spectrométrie de masse et analyses multiples, 46, , 2010, Cahier de formation biologie médicale. hal-01900150

**HAL Id: hal-01900150**

**<https://hal.science/hal-01900150>**

Submitted on 29 Oct 2018

**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.

***Analyses multiples  
des protéines : multiplexage  
en phase solide (puces  
à protéines) ou liquide ;  
applications en biologie  
médicale et perspectives***

***Pr Sylvain Lehmann, Stéphane Roche,  
Anne-Marie Dupuy***

# Introduction

---

Les méthodes d'analyse et d'investigation des phénomènes biologiques bénéficient depuis plusieurs années d'approches permettant de suivre un grand nombre de paramètres biologiques en parallèle (dit en multiplexe), grâce à des systèmes en milieu liquide ou sur des supports solides communément appelés biopuces (« biochips » en terminologie anglo-saxonne)[1-3]. Ces technologies, et en particulier les biopuces, ont d'abord été développées dans le domaine de la génomique permettant à ce jour de détecter plusieurs centaines de milliers de séquences en une seule analyse [4]. Dans ce domaine comme dans celui des protéines on peut constater des améliorations spectaculaires d'échelle et de complexité grâce à l'apport des nanotechnologies, de la micro-fluidique ou encore de la bio-informatique essentielle pour traiter la grande quantité de données ainsi générées.

L'application des analyses multiplexes aux paramètres protéiques fait partie du champ de la protéomique au sens large. Ce terme d'analyse protéomique, déjà défini dans les chapitres précédents, recouvre l'ensemble des approches, en particulier destinées à la recherche de bio-marqueurs, par l'étude du protéome, c'est-à-dire tous les peptides et protéines présents dans une cellule, un tissu ou un prélèvement biologique, à un instant donné et dans une situation physiopathologique donnée. L'exhaustivité dans ce domaine est limitée par les technologies disponibles (spectrométrie de masse...) et par la complexité des prélèvements, en particulier celle des fluides biologiques, comme le sang et le LCR, qui comportent plusieurs milliers de constituants avec des différences de concentrations couvrant dix ordres de magnitude [5,6]. Dans le domaine de la protéomique on peut classiquement séparer deux types d'approches ; la première est une recherche reposant sur des méthodes comme l'électrophorèse bidimensionnelle, les profils des gels 2D et le séquençage des peptides présents ou issus de la digestion des protéines d'un échantillon biologique ([voir Chapitre 1](#)). Elle permet la recherche de bio-marqueurs sans a priori car on ne connaît pas au départ l'identité des candidats qui seront sélectionnés. Inversement, dans un deuxième groupe d'approches, on part d'un ensemble de marqueurs dont on connaît l'identité, mais sans savoir lequel ou lesquels sont d'intérêt pour répondre à une question physiopathologique, diagnostique.... Les analyses multiplexes présentées dans ce chapitre font partie de ce dernier groupe d'analyses dont les résultats devraient permettre à terme l'établissement de profils et d'algorithmes présentant un intérêt clinique. Leurs applications concernent des maladies largement répandues : cancers, maladies cardiovasculaires, maladies métaboliques et maladies neurodégénératives. Actuellement, on distingue deux types d'analyses protéiques multiplexes, celles réalisées en milieu liquide et celles sur support solide. Le format des analyseurs va de systèmes de haut débit avec de nombreux paramètres jusqu'à des applications sur un faible nombre de paramètres, au lit du patient (« point of care ») et sur des systèmes intégrés (« lab-on-chips ») [1]. Nous nous concentrerons sur les applications tournées vers la clinique des analyses en milieu liquide ou avec des biopuces dédiées à la détection de peptides et de protéines.

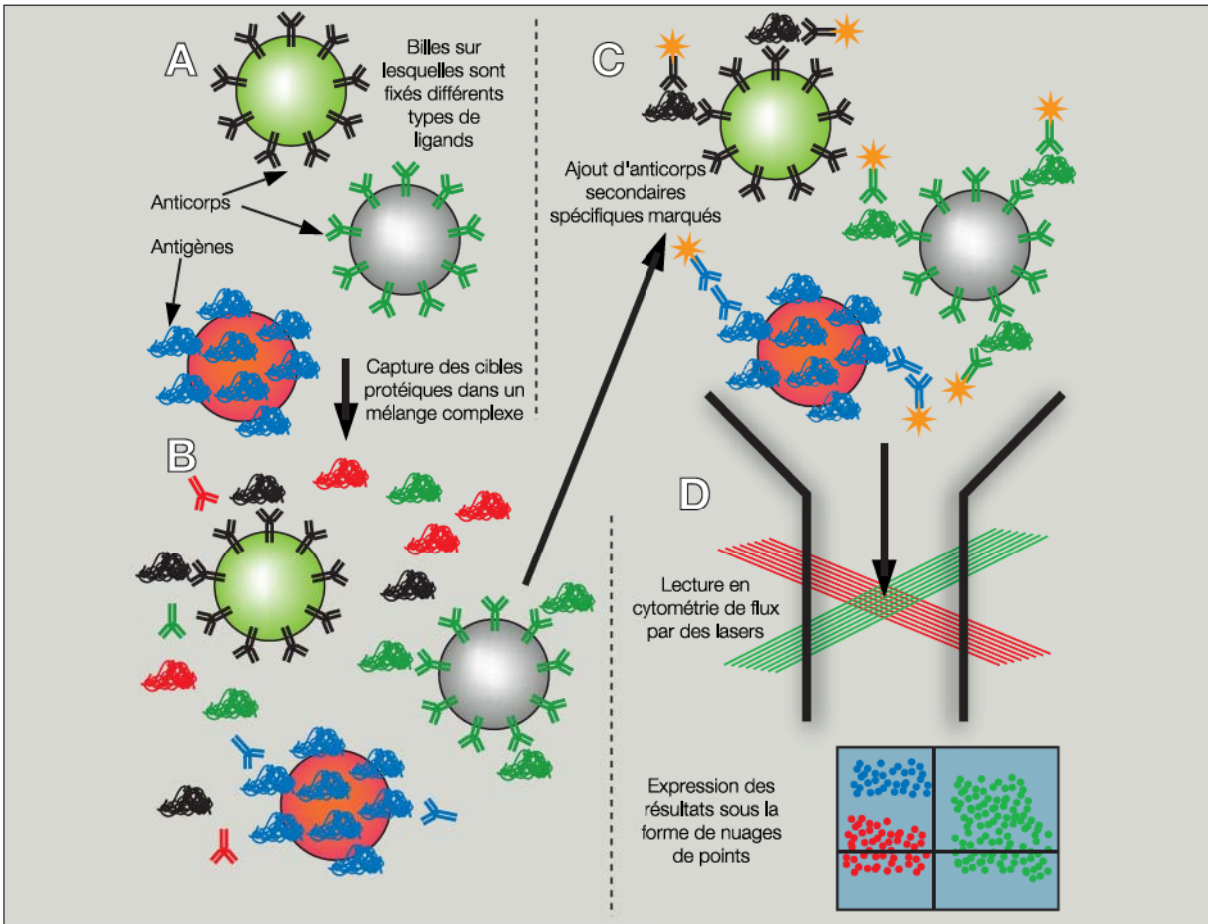
## Analyses multiplexes en milieu liquide

Cette approche repose principalement sur la technologie de cytométrie de flux dans laquelle des cellules, mais également des billes, circulent dans une veine liquide permettant de récupérer des informations individuelles de taille, de nombre ou de fluorescence grâce à un ou plusieurs lasers intégrés au système [2, 7]. L'exemple le plus achevé de cette approche est représenté par le système Luminex® associant deux faisceaux laser appliqués à la détection et au dosage de molécules de différents types : des peptides (cytokines...), des complexes antigènes-anticorps, d'autres protéines, des acides nucléiques ou encore des xénobiotiques. Cette technologie utilise des microsphères en polystyrène sur lesquelles sont fixées des ligands (anticorps, antigènes...) qui les rendent spécifiques des molécules à doser (figure 1). Ceci est rendu possible par la présence sur les billes activées de groupements carboxylate, amine ou thiol appropriés pour fixer de façon covalente les ligands. Le mode opératoire classique de cette approche est simple, rapide (3 à 4 h incluant la préparation des échantillons, l'analyse et l'obtention des résultats) et automatisable. Il comprend une étape réactionnelle initiale dans des plaques à 96 puits de type ELISA (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ») avec des volumes réactionnels faibles (10 à 50 µl) ce qui est intéressant pour réduire le volume de prélèvement nécessaire à la réalisation de nombreuses analyses. Au cours de l'analyse, qui est réalisée en phase liquide pour l'ensemble des étapes réactionnelles, les billes sont détectées et comptées en temps réel. Les résultats sont visualisables sous la forme de nuages de points répartis sur un graphe en fonction généralement du type et de la fluorescence des billes (intensité et longueurs d'onde utilisées). Le positionnement de ce nuage de points se fait au sein d'un masque pré-établi ce qui permet de s'assurer rapidement de la qualité de l'analyse (quantité et qualité des prélèvements et des réactifs...).

Il est possible de combiner les analyses multiplexes, par exemple jusqu'à 100 types de microsphères avec l'approche Luminex®. En effet, les billes ont incorporé au cours de leur fabrication deux fluorochromes différents permettant de les identifier avec l'un des lasers du module d'analyse micro-fluidique. L'identification des marqueurs fixés sur les billes dépend de la méthode utilisée ; le plus souvent dans le cas de marqueurs protéiques, il s'agit de la détection de fluorochromes couplés à un anticorps de révélation ou au produit d'amplification de détection qui aura été préalablement ajouté au milieu réactionnel (figure 1) [2]. Cette technologie a été installée dans de nombreux analyseurs comme les systèmes xMAP® (Luminex), Bio-Plex® (Bio-Rad) et QUANTA-Plex® (Inova/Menarini) pour lesquels des différences résident principalement dans les suites logicielles et les analyses disponibles. Hors la technologie Luminex®, des systèmes basés sur la cytométrie de flux capables d'analyser à la fois des cellules et des microbilles de différentes taille et/ou fluorescentes sont également disponibles. Il s'agit par exemple du système FACSAarray® développé par BD Biosciences ([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)) dont le principe général d'analyse reste inchangé. En conclusion, les analyses multiplexes en milieu liquide sont des approches très versatiles jouissant d'une grande capacité d'analyse dans de nombreuses disciplines biologiques.

### Figure 1 : Analyses multiplexes en milieu liquide.

(A) : Des microbilles sont préparées de telle sorte que des ligands spécifiques (anticorps, antigènes...) soient fixés à leur surface. Ces billes peuvent différer les unes des autres par leur fluorescence ou leur diamètre ; (B) : Les billes sont mises en contact avec un échantillon biologique afin de réaliser une capture des cibles dans des conditions optimales ; (C) : Après rinçage, les billes sont généralement incubées avec un réactif secondaire (anticorps marqués...) qui reconnaît la cible, puis elles sont à nouveau rincées ; (D) : Les billes sont dirigées à travers une veine liquide permettant de récupérer des informations individuelles de taille, de nombre et de fluorescence grâce à un ou plusieurs lasers intégrés au système. Le comptage en temps réel des billes permet une représentation en nuages de points en fonction généralement du type et de la fluorescence des billes (intensité et longueurs d'onde utilisées).



## Analyseurs multiparamétriques miniaturisés

Il s'agit d'analyseurs qui ont la particularité d'être transportables, utilisables au lit du patient en urgence et/ou de façon délocalisée pour mesurer en une fois un petit nombre de bio-marqueurs. Il font ainsi partie du groupe d'analyseurs dit « Point of Care Testing » (POCT) utilisés principalement en biologie délocalisée. Ce type d'approche est très répandu à l'étranger et en particulier aux Etats-Unis. En France les paramètres principalement concernées par la biologie délocalisée sont : glycémie, coagulation, gaz du sang et pH, électrolytes, hémoglobine et acide lactique. Le développement de la délocalisation en France est prudent en raison des précautions prises en terme de contrôle de qualité et de validation biologique. Dans le domaine des analyses multiples de paramètres protéiques, le développement de la miniaturisation et des micro- ou nanotechnologies (micro-fluidique...) permet théoriquement d'adapter de nombreuses analyses

à cette approche. En pratique il n'y a que peu d'analyseurs disponibles pour la biologie clinique. Le plus démonstratif et versatile semble être le système Triage® (Biosite) qui permet de doser en même temps plusieurs paramètres sous la forme de panels adaptés à une situation pathologique donnée ([tableau 1](#)) [8].

**Tableau 1 : Exemples de panels pour la biologie clinique.**

Domaine	Paramètres	Fabriquant	Technologie
Cancérologie	MIF, ostéopontine, leptine, CA-125, prolactine, IGF-II	Millipore	Cytométrie
Cardiovasculaire	Créatine-kinase MB (CK-MB), Fatty Acid Binding Protein (FABP), myoglobine, troponine I	Randox	Puce
Cardiovasculaire	CK-MB, myoglobine, troponine I, BNP, D-dimère	Triage	Microfluidique
Coagulation	$\alpha$ 1-antitrypsine, antithrombine, apolipoprotéine H, F.V, F.VII, F.IX, F.XI, F.XII, F.XIII, protéine C, protéine S, prothrombine, vWF	Bender System	Cytométrie
Cytokines et chimiokines	IL-8, CXCL-5, FGF basique, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-1F1, IL-1F3, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF $\alpha$ , TPO, VEGF	R&D System	Cytométrie
Cytokines et chimiokines	IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17, GM-CSF, G-CSF, MCP-1, MIP $\beta$	Bio-Rad	Cytométrie
Cytokines et chimiokines	C5a, CD-40 ligand, G-CSF, GM-CSF, GRO1-309, sICAM-1, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-17E, IL-23, IL-27, IL-32 $\alpha$ , IP-10, I-TAC, MCP-1, MIF, MIP-1 $\alpha$ & $\beta$ , serpine E1, RANTES, SDF-1, TNF $\alpha$ , sTREM-1	R&D System	Membranes
Cytokines et chémokines	EGF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\gamma$ , MCP-1, TNF $\alpha$ , VEGF	Randox	Puce
Fertilité	LH, FSH, progestérone	Mesocale	Plaques ELISA
Fertilité	CEstradiol, Follicle Stimulating Hormone (FSH), Luteinizing Hormone (LH), progestérone, prolactine (PRL), testostérone	Randox	Puces
Immunologie	HLA IgG : anticorps contre les antigènes de classe I et/ou de classe II	Gen-Probe	Cytométrie
Infectiologie	Recherche d'anticorps contre 14 sérotypes de pneumocoques	Luminex	Cytométrie
Inflammation	$\alpha$ 2-macroglobuline, CRP, ferritine, fibrinogène, procalcitonine, haptoglobine, SAA, SAP, TPA	Bio-Rad	Cytométrie
Métabolisme osseux	PAL, ostéocalcine, ostéonectine, ostéoprotégérine, sclérostine	Mesocale	Plaques ELISA
Métabolisme osseux	ACTH, insuline, leptine, ostéocalcine, ostéopontine, ostéoprotégérine, PTH	Millipore	Cytométrie
Neurologie	Peptides Ab37, Ab38, Ab39, Ab40, Ab42...	Bio-Rad	SELDI-TOF
Neurologie	Peptides Ab42, tau, P-tau (181)	Innogenetics	Cytométrie
Neurologie	Peptides Ab38, Ab40, Ab42	Mesocale	Plaques ELISA

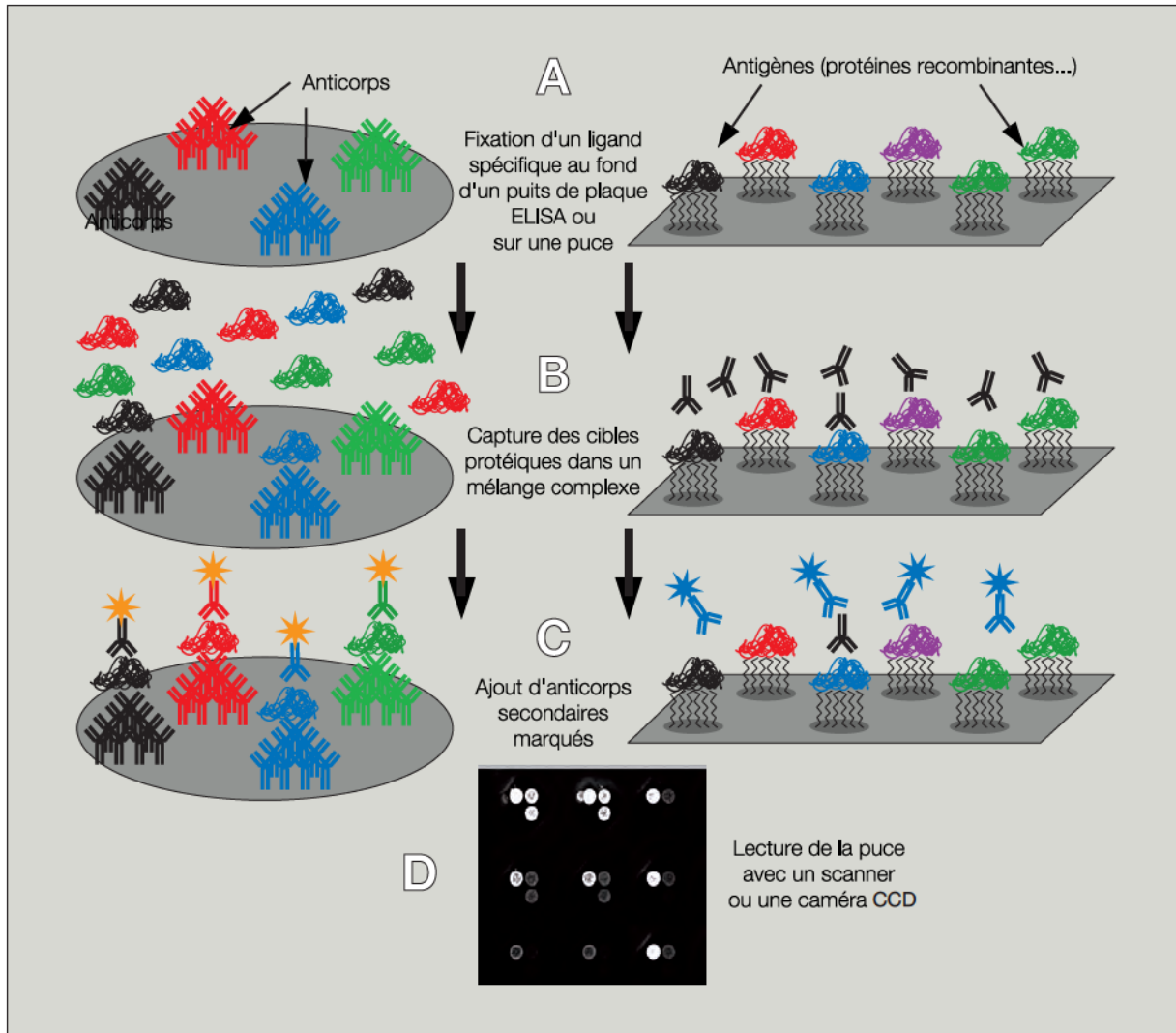
## Analyses multiplexes en phase solide

Le principe général de ces analyses est la détection et la quantification d'une interaction entre un ligand fixé à une surface et un bio-marqueur à analyser. Utilisée en multiplexe et pouvant donc concerner de nombreux paramètres protéiques, il s'agit de fait d'une approche protéomique. Les applications vont de la caractérisation d'une fonction protéique spécifique (phosphorylation...), ou de l'étude d'affinité moléculaire ( $K_D$ ...) avec des ligands divers (protides, glycanes, acide nucléiques...), à la détection de molécules déjà connues (notamment pour la biologie clinique). Les biopuces présentent des surfaces de différentes natures (nitrocellulose, silice, polymères, particule d'or, support chromatographique...) qui, comme pour les billes décrites précédemment, vont être traitées ou « fonctionnalisées » pour retenir un premier composant qui sert de ligand. La miniaturisation du dépôt de ligand permet de produire des puces avec plusieurs milliers de dépôts en goutte (ou « spots ») par centimètre carré ; on parle alors de « microarray ». Les formats les plus classiques sont en fait des « puces à anticorps » (figure 2). Dans ces biopuces, des anticorps spécifiques de cibles peptidiques ou protidiques sont déposés avec des densités variables, jusqu'à plusieurs milliers dans le domaine de la recherche. En biologie clinique ces systèmes ne comportent souvent que quelques dizaines d'anticorps différents souvent regroupées sous la forme de panels thématiques (tableau 1). Il est en effet délicat de combiner avec les contraintes de la clinique (importance de la reproductibilité intra et inter-expérience, des réactions croisées, de la linéarité) des marqueurs multiples en utilisant des anticorps aux spécificités différentes. En biologie clinique, le prélèvement (sérum, LCR...) est classiquement utilisé sans marquage préalable des protéines et les cibles capturées sont détectées grâce à un deuxième anticorps marqué (enzymatique, fluorescent, biotinylé...). La lecture se fait ensuite par une méthode adaptée au marquage : chromogénique, par électro-chimioluminescence, transfert d'énergie de fluorescence ou en simple fluorescence, avec une lecture par des systèmes de type scanner ou caméra CCD (« Charge Coupled Device ») (figure 2). Ce type de puces utilisant deux anticorps (méthode sandwich) réalise ainsi des dosages comparables à des ELISA en multiplexe (voir la préparation des anticorps, Chapitre 8).

On retrouve cela notamment sur le système Investigator® de la société Randox qui propose différents panels déposés sur des puces de silice dans un format propriétaire et avec des seconds anticorps fluorescents (tableau 1). La société MSD® propose des ELISA multiplexes en plaques 96 puits avec une révélation par électro-chimioluminescence. Enfin un dernier exemple qui se différencie par sa méthode de détection des marqueurs capturés est représenté par l'analyseur SELDI-TOF® (« Surface Enhanced Laser Desorption/ Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry ») de la société Bio-Rad (voir Chapitre 1). Cet appareil permet la détection de marqueurs par spectrométrie de masse ce qui amène à quantifier des variants du paramètre recherché comme dans le cas des peptides A, dans la maladie d'Alzheimer [9].

**Figure 2 : Analyses multiplexes en phase solide.**

(A) : Les surfaces (biopuces, membranes, lame de verre..) sont traitées pour retenir un premier type de composé qui sert de ligand. Il peut s'agir d'anticorps ou d'autres types de ligands (antigènes, récepteur..) ; (B) : Les surfaces sont mises en contact avec un échantillon biologique afin de réaliser une capture des cibles dans des conditions optimales ; (C) : Après rinçage, les surfaces sont généralement incubées avec un réactif secondaire (anticorps marqué..) qui reconnaît la cible, puis elles sont à nouveau rincées ; (D) : Les puces ou membranes sont ensuite analysées avec un système de lecture de type scanner ou caméra CCD en fonction de la technologie. Une image de la puce permettant la quantification des spots est alors obtenue.



Enfin, notons parmi les autres types de puces utilisées en biologie clinique, celles destinées à la détection d'anticorps présents dans les liquides biologiques grâce à des molécules antigéniques fixées sur la puce (figure 2). Ces approches sont particulièrement intéressantes pour la détection d'anticorps dans les pathologies auto-immunes et dans le domaine de l'infectiologie [10-12].

Dans toutes ces approches, l'analyse des résultats est effectuée à l'aide d'outils informatiques dédiés qui prennent en compte les valeurs de standards internes mesurés sur la puce. A terme, l'intérêt de tels dosages multiplexes sera dans l'utilisation d'algorithmes qui permettront le calcul de scores ou d'indices donnant des probabilités diagnostiques ou pronostiques (voir Chapitre 4).



## Panels multiplexes

Il existe une grande diversité d'approches multiplexes qui regroupent les cibles protéiques d'intérêt en fonction des applications. En recherche, ce sont principalement les panels de détection des phosphoprotéines et des acteurs de voies spécifiques (apoptose, protéasome...) qui apportent un bénéfice considérable aux études des modulations physiologiques, pathologiques ou par des agents pharmacologiques des multiples voies métaboliques ou de signalisation cellulaire, qui sont souvent très complexes. Dans le domaine des panels cliniques qui nous intéressent ici, les marqueurs proposés visent une même pathologie, ces marqueurs pouvant être très divers, ou inversement une même famille de marqueurs peuvent jouer un rôle physiopathologique coordonné ([tableau 1](#)). Le but est de tendre vers une exploration cohérente dans le cadre du suivi d'un état pathologique et de permettre l'utilisation d'algorithmes pour le calcul de scores comme dit précédemment.

Actuellement, les grands domaines concernés par les méthodes d'analyses multiplexes sont l'immunologie, la microbiologie, la virologie et la biochimie. En microbiologie et virologie, sont par exemple disponibles des multiplexes permettant de déterminer la présence et le titre des anticorps dirigés contre différentes protéines de nombreux agents infectieux (HIV, HPV, VRS...). Une des premières applications concerne l'analyse multiplexe d'interleukines et sous de multiples formats présentés par plusieurs sociétés ([tableau 1](#)). De six à plusieurs dizaines d'interleukines et de cytokines peuvent être ainsi simultanément identifiées et quantifiées grâce à des standards appropriés. Ceci est particulièrement intéressant en immunologie définissant ainsi une nouvelle approche des maladies auto-immunes et inflammatoires. Par ailleurs, dans le domaine de l'histocompatibilité, de plus en plus de laboratoires ont recours à la technologie Luminex® pour le typage HLA (HLA-A, HLA-B...), le dépistage et l'identification en routine des anticorps anti-HLA de classe I et de classe II d'isotype IgG car la méthode est simple, sensible, reproductible et standardisée. Comme listés dans le [Tableau 1](#), on retrouve en fait sur le marché de nombreux panels couvrant divers états physiopathologiques : inflammation, diabète, infertilité, dysfonctionnement hormonal, cancer, maladies cardiovasculaires, neurodégénérescence...

## Conclusion

---

Les analyses multiples de paramètres protéiques présentent a priori un grand potentiel dans le domaine clinique car elles permettent la mesure simultanée de nombreux paramètres et ceci avec un faible volume d'échantillon. Elles ouvrent la porte également à l'utilisation d'algorithmes permettant sur la base des résultats obtenus de calculer des indices ou des scores indiquant, avec

une probabilité plus ou moins grande, la présence d'une pathologie, d'un type d'évolution ou de réponse à un traitement.

Dans le domaine de la protéomique fondamentale ou de la recherche clinique ce type d'approche est très largement utilisé, notamment pour faire l'étude moléculaire d'une situation donnée, ou pour la recherche de nouveaux bio-marqueurs. Par contre, en biologie clinique, l'utilisation reste limitée, sauf dans des domaines particuliers comme l'immunologie. Cette dissociation est probablement en relation avec, dans le cas de la recherche, la possibilité de faire une étude de grande ampleur à un moment donné et souvent dans un modèle intégré (cellules, animaux...). La solidité des résultats obtenus est alors dépendante de la précision analytique au sein d'une même expérience, avec les mêmes lots de réactifs et les mêmes conditions pré-analytiques. Dans le domaine clinique, il est nécessaire de réaliser des analyses et de comparer les valeurs au cours du temps et dans une population composée de nombreux patients/témoins différents. Il existe ainsi une très grande exigence sur la solidité des mesures en fonction des lots de réactifs et de puces/billes/membranes, pour l'utilisation d'un contrôle de qualité, et pour la comparaison à des méthodes de référence. Or, dans les analyses multiplexes telles que décrites précédemment la modification d'un seul paramètre risque d'altérer l'ensemble des mesures. On a donc une multiplication des contraintes et des risques d'erreurs. De même, si un paramètre nécessite occasionnellement une modification de protocole (dilution par exemple..) cela va finalement obliger à doser à nouveau tous les paramètres. Du point de vue pratique, les panels pré-établis par les sociétés ne répondent pas toujours aux besoins ([tableau 1](#)). On y retrouve en effet de nombreux marqueurs dont l'intérêt clinique n'a pas été à ce jour démontré, et inversement, des marqueurs intéressants pour une pathologie donnée sont souvent absents. Ce manque de cohérence global est probablement en relation avec le manque de disponibilité des réactifs ou leur incompatibilité (réactions croisées). Ces difficultés expliquent certainement le faible taux de pénétration actuel de ces technologies multiplexes au sein des laboratoires, avec cependant quelques exceptions comme l'immunologie, montrant qu'à maturité ces approches seront très intéressantes.

## Bibliographie

---

1. Dupuy AM., Lehmann S. and Cristol JP. Protein biochip systems for the clinical laboratory. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005 ; 43 : 1291-1302.
2. Lizard G., Monier S., Prunet C., Duviollard L. and Gambert P. Microspheres, nanospheres and flow cytometry : from cellular to molecular analysis. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 2004 ; 62 : 47-52.
3. Stoevesandt O., Taussig MJ. and He M. Protein microarrays: high-throughput tools for proteomics. *Expert. Rev. Proteomics* 2009 ; 6 : 145-157.
4. Dufva M. Introduction to microarray technology. *Methods Mol. Biol.* 2009 ; 529 : 1-22.
5. Roche S., Gabelle A. and Lehmann S. Clinical Proteomics of the Cerebrospinal Fluid : towards the discovery of new biomarkers. *Proteomics: Clin. Appl.* 2008 (in press).

6. States DJ., Omenn GS., Blackwell TW., Fermin D., Eng J., Speicher DW. and Hanash SM. Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. *Nat. Biotech.* 2006 ; 24 : 333-338.
7. Nolan JP. and Mandy F. Multiplexed and microparticle-based analyses : quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems. *Cytometry A* 2006 ; 69 : 318-325.
8. Apple FS., Christenson RH., Valdes R. Jr, Andriak AJ., Berg A., Duh SH., Feng YJ., Jortani SA., Johnson NA., Koplen B., Mascotti K. and Wu AH. Simultaneous rapid measurement of whole blood myoglobin, creatine kinase MB, and cardiac troponin I by the Triage cardiac panel for detection of myocardial infarction. *Clin. Chem.* 1999 ; 45 : 199-205.
9. Lewczuk P., Esselmann H., Groemer TW., Bibl M., Maler JM., Steinacker P., Otto M., Kornhuber J. and Wiltfang J. Amyloid beta peptides in cerebrospinal fluid as profiled with surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry : evidence of novel biomarkers in Alzheimer's disease. *Biol. Psych.* 2004 ; 55 : 524-530.
10. Lalvani A., Meroni PL., Millington KA., Modolo ML., Plebani M., Tincani A., Villalta D., Doria A. and Ghirardello A. Recent advances in diagnostic technology: applications in autoimmune and infectious diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008 ; 26 : S62-66.
11. Roche S., Dauvilliers Y., Tiers L., Couderc C., Piva MT., Provansal M., Gabelle A. and Lehmann S. Autoantibody profiling on high-density protein microarrays for biomarker discovery in the cerebrospinal fluid. *J. Immunol. Methods* 2008 ; 338 : 75-78.
12. Tozzoli R. Review : The diagnostic role of autoantibodies in the prediction of organ-specific autoimmune diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008 ?