



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
Département de Biologie



Licence Sciences et Techniques (LST)

Biologie et Santé

BS

PROJET DE FIN D'ETUDES

**Les méthodes électrophorétiques Electrophorèse sur gel
d'agarose Electrophorèse Capillaire**

Présenté par :

◆ **Rochdi Mouad**

Encadré par :

- ◆ **LT colonel Ouzzif Zohra (HMIMED V)**
- ◆ **Pr El Farricha Omar (FST)**

Soutenu Le 14Juin 2012 devant le jury composé de:

- **Pr El Farricha Omar**
- **Pr Tahri Joutei Mohammed Ali**
- **Pr Ouzzif Zohra**

Stage effectué à L'Hôpital Militaire d'Instruction Med V –RABAT-

Année Universitaire 2011 / 2012

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FES – SAISS

☒ B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☒ Ligne Directe : 212 (0)5 35 61 16 86 – Standard : 212 (0)5 35 60 82 14

Site web : <http://www.fst-usmba.ac.ma>



Sommaire

Dédicace

Remerciements

Présentation de la structure

Table des matières

Introduction

I -Généralités sur les protéines Sériques	5
1- Synthèses des protéines.....	5
• Transcription.....	5
• Traduction.....	5
2- Heteroginité des proteines.....	5
3- Les différentes fractions protéiques.....	7
3-1- Albumine	7
3-2- Les globulines	7
• Les α -globulines	7
• Les β -globulines	9
• Les γ -globulines.....	10
4- Caractéristiques et propriétés générales des immunoglobulines	10
II- Exploration des protéines par électrophorèse.....	12
1- Historique de l'électrophorèse.....	12
1-1- Electrophorèse sur support plan	12
1-2- Electrophorèse capillaire	13
2- Définition.....	13
3- Principe générale de l' électrophorèse.....	13



3-1- Electrophorèse sur Gel d'agarose.....	14
3-2- Electrophorèse capillaire.....	15
• Electro- migration.....	16
• Electro- osmose.....	17
4- Valeurs sémiologiques.....	17
4-1- Protidémie.....	17
4-2- Variations de la protidémie	17
• Hyperprotidémie	17
• Hypoprotidémie.....	18
4-3- L'interprétation du protéinogramme du sérum humain Normal	18
4-4-Interprétation illustrée des principaux profils électrophorétiques anormaux	20
A- Bloc Bêta-Gamma	20
B- Syndrome néphrotique.....	21
C- Syndrome inflammatoire	22
D- Hypogammaglobulinémie.....	24



<i>E- Hypergammaglobulinémie polyclonale.....</i>	<i>25</i>
<i>F- Hypergammaglobulinémie monoclonale.....</i>	<i>26</i>
<i>G- Bisalbuminémie.....</i>	<i>2</i>
<i>8</i>	

III-Matériel et méthode

<i>d'utilisation.....</i>	<i>29</i>
1- <i>Matériel.....</i>	<i>2</i>
9	
2- <i>Stade pré- analytique.....</i>	<i>29</i>
3- <i>Collecte des échantillons.....</i>	<i>29</i>
4- <i>Électrophorèse capillaire.....</i>	<i>30</i>
5- <i>Electrophorèse sur Gel d'Agarose.....</i>	<i>30</i>
6- <i>Comparaison entre « Hydrasys » et « Capillarys ».....</i>	<i>32</i>

IV-

<i>Conclusion.....</i>	<i>35</i>
-------------------------------	------------------

Références Bibliographiques



Introduction

Les protéines sont les constituants les plus abondants du sérum. Elles remplissent les fonctions essentielles à la survie de la cellule.

la diversité et l'importance de ces protéines laisse supposer que toute variation (synthèse ,structure, concentration) les touchant entrainera une variation de l'état physiopathologique .

Le médecin dans son diagnostic fait parfois appel à des examens complémentaires tels que le dosage de certains paramètres biologiques et /ou l'exploration des protéines. L'évolution de la biologie médicale a fait qu'un même paramètre peut être dosé par des techniques différentes et donner des résultats difficilement interprétables par le médecin prescripteur .

Parmi les techniques d'exploration des protéines sériques au laboratoire figure l'électrophorèse qui est une technique qui permet de mettre en évidence et de séparer les différents constituants d'un liquide afin de permettre leurs isolement . Ce phénomène est obtenu grâce à l'application d'un champ électrique .

L'électrophorèse apporte de nombreux renseignements en particulier sur l'état inflammatoire, nutritionnel, infectieux et permet le dépistage et le suivi d'une maladie par exemple d'une immunoglobulinopathie.

La systématisation de l'électrophorèse des protéines sériques dans le bilan d'entrée de tout malade hospitalisé est maintenant habituelle dans de nombreux services cliniques (médecine interne, hématologie par exemple). Ceci induit une augmentation significative de la demande de cette analyse.



L'objectif actuel de la biologie au plan international est d'assurer la transférabilité des résultats des analyses biologiques entre les laboratoires utilisant des systèmes analytiques différents.

Dans ce contexte, et afin d'apporter des approches de standardisation, il est nécessaire d'étudier les corrélations et les discordances entre ces systèmes y compris ceux destinés à la réalisation de l'électrophorèse des protéines sériques. Dans ce travail, nous nous proposons de présenter l'électrophorèse des protéines sériques en capillaire « Capillarys » (SEBIA) à la méthode semi-automatique sur gel d'agarose « Hydrasys » (SEBIA) méthodologie actuellement considérée comme référence.

Avant de commencer notre présentation des deux automates, nous traiterons des rappels sur les protéines sériques et leur exploration par électrophorèse.

I -Généralités sur les protéines sériques :

1- Synthèse des protéines :

L'assemblage des acides aminés sur la base de l'information présente dans les gènes conduit aux protéines.

La synthèse des protéines se déroule en 2 étapes :

- **La transcription :**

Où la séquence d'ADN codant le gène associé à la protéines est transcrite en ARNm

- **La traduction :**



Où l'ARNm est traduit en protéines en fonction du code génétique . Une fois la traduction terminée , la protéine nouvellement formée se détache du ribosome .

C'est le début d'un voyage au sein de la cellule et hors de la cellule .La nouvelle protéine subit des modifications post traductionnelles qui déterminent sa fonction et sa localisation . Le réarrangement génétique, l'épissage différentiel et les régulation post traductionnelles sont à la base de l'hétérogénéité des protéines .

2- Hétérogénéité des protéines :

l'hétérogénéité des protéines est observée sur différentes plans :

sur le plan structural, il existe plus de 125 protéines plasmatiques isolables par électrophorèse .

Les protéines remplissent des fonctions très diverses au sein de la cellule et de l'organisme telles que :

- les fonctions immunitaires
- les fonctions hémostatiques
- l'homéostasie corporelle : la pression oncotique, le pH , la balance ionique ;

- les transports de diverses substances endogènes ou exogènes
- les fonctions antiprotéasiques
- les fonctions de communication
- les fonctions de signalisation
- les fonctions de stockage
- les fonctions de reconnaissance . etc.

Il existe de très grandes différences de concentrations entre les protéines du sang .

On peut ainsi classer les protéines en fonction de leur concentrations plasmatiques .

Protéines prédominantes	10-40 g/l	Albumine Immunoglobulines G
Protéines Majeures	1-10 g/l	fibrinogène, transferrine,IgA ,IgM



Protéines Mineurs	0,1- 1 g/l	Céruleplasmine Plasminogène
Proteines en traces	< 0,1 g/l	CRP RBP

Tableau : Classification des protéines sérique en fonction de leur concentration.

3- Les différentes fractions protéiques

3-1- Albumine :

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma humain, elles sont synthétisées par le foie. Elle représente environ 60% des protéines totales. C'est une holoprotéine d'une seule chaîne peptidique de 564 acides aminés. Elle a un pH de 4,7 et elle a une demi-vie de 15 à 20 jours. Elle assure :

- ❖ Le transport de substances plus ou moins solubles.
- ❖ Le maintien de la pression oncotique.

L'augmentation de la concentration d'albumine dans le sérum est peu fréquente (hyper albuminémie). Elle est provoquée par une déshydratation sévère.

Alors que sa diminution (hypo albuminémie) est causée par plusieurs facteurs :

- Une anomalie de synthèse par exemple en cas d'insuffisance hépatique.
- Une perte excessive dans le cas de syndrome néphrotique.
- Un catabolisme exagéré provoquant sa destruction.
- Une réaction inflammatoire.
- Une malnutrition ou malabsorption.
- Un hémodilution chez la femme enceinte.

3-2-Les Globulines :



Les Globulines sont également différenciées lors d'une électrophorèse des protéines sériques, où elles migrent moins que l'albumine. On peut également les subdiviser en trois groupes :

➤ **Les α -globulines :**

Elles sont fabriquées par les cellules du foie, et sont surtout impliquées dans le transport de substances liposolubles dans le sang.

Les protéines les plus importantes des α -globulines se retrouvent majoritairement au sein des α_2 -globuline avec notamment :

- Des protéines de l'inflammation : α_2 -macroglobuline, haptoglobine, Céruloplasmine.
- des lipoprotéines : High Density Lipoprotein (HDL).
- L'augmentation de leur concentration plasmatique peut être causée par :
 - syndrome inflammatoire.
 - syndrome néphrotique. (augmentation de α_2 globulines).
 - Diabète.
- La diminution de leur concentration plasmatique indique généralement :
 - Une insuffisance hépatique.
 - Une hémolyse (haptoglobine) .
 - Entéropathies.
 - Une malnutrition ou malabsorption.



- déficit en α 1 antitrypsine.
- Fuite protéique cutanée, digestive ou rénale.

- **Les β -Globulines :**

Elles sont également fabriquées par les cellules du foie, et sont impliquées dans le transport de substances liposolubles dans le sang. Les β -globulines regroupent des protéines nombreuses et variées dont les plus importantes sont :

- Des protéines de l'inflammation : protéine C réactive, complément C3.
- Des immunoglobulines : IgA, IgM.
- Des lipoprotéines: Very Low Density Lipoprotein (VLDL); Low Density lipoprotein(LDL).
- Des protéines de transport : transferrine, Hémopexine.
 - L'augmentation de leur concentration plasmatique peut être causée par :
 - Syndrome inflammatoire.



- Syndrome néphrotique.
- Anémie.
- Atteinte hépatique.
 - La diminution de leur concentration plasmatique est provoquée par :
 - Une insuffisance hépatique.
 - Une hémolyse.
 - Entéropathies.
- Une malnutrition.

➤ *Les Y globulines : (ou immunoglobulines)*

Elles sont aussi appelées anticorps qui ont un rôle majeur dans les processus de défense de notre organisme, et elles sont synthétisées au niveau des cellules plasmatiques et des lymphocytes B, dans les tissus lymphoïdes ,en réponse a une stimulation antigénique.

Les globulines contribuent également en maintien de l'équilibre osmotique entre les compartiments intra vasculaire et interstitiel.

4-Caractéristiques et Propriétés Générales des immunoglobulines

(Ig) :



on distingue 5 des immunoglobulines (IgG,IgA,IgD,IgE) qui diffèrent par leur poids moléculaire ,leur charge, leur composition en acides aminées ,et en sucre.

Ces classes sont divisées en sous classes : IgG(1,2,3,4) – IgA (1,2) –IgM-IgD-IgE .

Chaque classe d'Ig possède des propriétés biologiques propres :

- ✚ Les IgG sont produites lors d'un contact avec un antigène qui se prolonge ou lors d'un second contact de l'organisme avec un antigène .Elles jouent

un rôle primordial dans la défense de l'organisme contre les maladies infectieuses : chez l'adulte, elles représentent la majorité des immunoglobulines ;pendant la grossesse ,les IgG1,IgG3,et Ig G4 sont les seules immunoglobulines capables de traverser le placenta grâce à la présence de récepteurs spécifiques de ces immunoglobulines sur le placenta . Elles jouent donc un rôle primordial dans la défense du fœtus et du nourrisson contre les infections.

- ✚ Les IgA représentent la classe principale des anticorps présents dans la salive, les larmes, le lait, et les sécrétions muqueuses .Elles constituent donc la première ligne de défense locale contre les agents infectieux.



- ✚ Les IgM sont les premiers anticorps synthétisés au cours de la réponse immunitaire .Leur présence est transitoire dans les réponses immunitaires. Cette propriété permet de faire le diagnostic de certaines maladies primo-infections .De la même façon, la présence d'IgM spécifiques dans le sang de l'enfant à la naissance permet de faire le diagnostic d'infection congénitale, puisque les IgM maternelles ne traversent pas le placenta.
- ✚ Les IgD sont en concentration faible dans le sérum (environ 10 fois moins d'IgD que sont d'IgM).Elles comme les IgM, la propriété d'apparaître à la surface des lymphocytes B en voie de différenciation.
- ✚ Les IgE sont présentés à l'état de traces dans le sérum .Elles jouent un rôle bénéfique dans l'immunité antiparasitaire et un rôle dans un certain type d'allergie (hypersensibilité).

II- Exploration des protéines par électrophorèse

L'électrophorèse de zone constitue la technique la plus utilisée dans les laboratoires pour l'exploration des protéines sériques . Depuis son invention dans les années 1930 par Arne Wilhelm Kaurin Tiselus, cette technique a beaucoup évolué

1- Historique de l'électrophorèse :

1-1- Electrophorèse sur support plan :



L'électrophorèse a été décrite pour la première fois par Tiselius dans les années 1930 en veine liquide, c'est-à-dire libre de tout support.

L'amélioration des performances analytiques de l'électrophorèse a ensuite été obtenue grâce au support migratoire qui augmente la résolution tout en diminuant les courants de convection et le phénomène de diffusion. Les supports ont évolué du papier aux gels :

- P.König et D.Von Klobusitzky : séparation des protéines par électrophorèse sur papier
- Emmett L. Darrum /séparation des protéines plasmatiques sur papier et commercialisation.
- O. Smithies : électrophorèse sur gel d'amidon .
- J.König : électrophorèse sur acétate de cellulose .
- L.R. Elevation : électrophorèse sur gel d'agarose .
- L. Orstein, B.J. Davis, S. Raymond, L. Weintraub : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).

1-2- Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique analytique d'introduction relativement récente. Elle s'est beaucoup diversifiée et donné naissance à toute une série d'approches telles que l'électrophorèse capillaire de zone, l'électrophorèse capillaire en gel, la chromatographie capillaire électrocinétique micellaire, la focalisation isoélectrique capillaire ou l'isotachophorèse capillaire.

- Les premières analyses électrophorétiques capillaires ont été introduites dans les années 1950 par S.Hjerten (capillaire de 300µm) .
- En 1981 J.Jorgensen et K.D Luckacs utilisent des capillaires de verre de 75 µm de diamètre .
- S.Terabe et AL introduisent en 1984 la chromatographie capillaire électrocinétique micellaire (MEKC) .
- Bushey et Jorgensen ont démontré le pouvoir résolutif de cette technique en séparant des composés isotopiques substitués.

2-Définition de l'électrophorèse :

L'électrophorèse est une technique physicochimique qui sépare des constituants ionisés dans un champ électrique. Elle permet la séparation des protéines sériques en



fractions de mobilités différentes, avec obtention de leurs pourcentages relatifs. Couramment utilisée en pratique cliniques, cette analyse reflète l'ensemble des protéines sériques. Elle participe à l'établissement du diagnostic de certains cas d'inflammations, de cancers ou d'infection.

3-Principe général de l'électrophorèse des protéines :

Soumises à un champ électrique dans un tampon donné, les protéines (chargées) se déplacent à différentes vitesses qui résultent de plusieurs facteurs :

- Leur mobilité propre, sous l'effet d'un champ électrique et du tampon (charge globale de la protéine, pH du tampon, taille de la molécule).
- Le courant d'électro-endosmose.
- La texture du support ou porosité .
- Le courant d'évaporation (effet joule).
- La diffusion .
- La mobilité d'une particule migrant dans un champ électrique uniforme est proportionnelle à sa charge ,inversement proportionnelle à son rayon et à la viscosité du milieu

3-1 Electrophorèse sur gel d'agarose :

Dans ce cas, la séparation se produit sur un support : le gel d'agarose. Ce dernier offre une meilleure sensibilité et une meilleure résolution des fractions protéiques par rapport à ses prédécesseurs (papier, amidon, acétate de cellulose)

C'est une amélioration de l'électrophorèse de zone. Le gel initial est transparent ce qui permet une bonne évaluation par densitomètre (après coloration spécifique de différentes fractions). La faible concentration en agarose explique la large porosité et la libre migration des molécules sans phénomènes de distorsions. Les gels haute résolution (HR) actuellement utilisés ont encore amélioré les performances. L'existence des kits d'"Hydragel" protéines prêts à l'emploi permet une semi automatisation de cette technique traditionnelle d'électrophorèse.

L'électrophorèse sur gel d'agarose conduit après migration et coloration à une plaque sur laquelle les différentes fractions sont colorées en fonction de leur pourcentage

L'intégration densitométrique de la plaque d'électrophorèse conduit à un profil avec les pourcentages des différentes fractions et les taux en gramme/litre si le taux de protéidémie totale est connu.

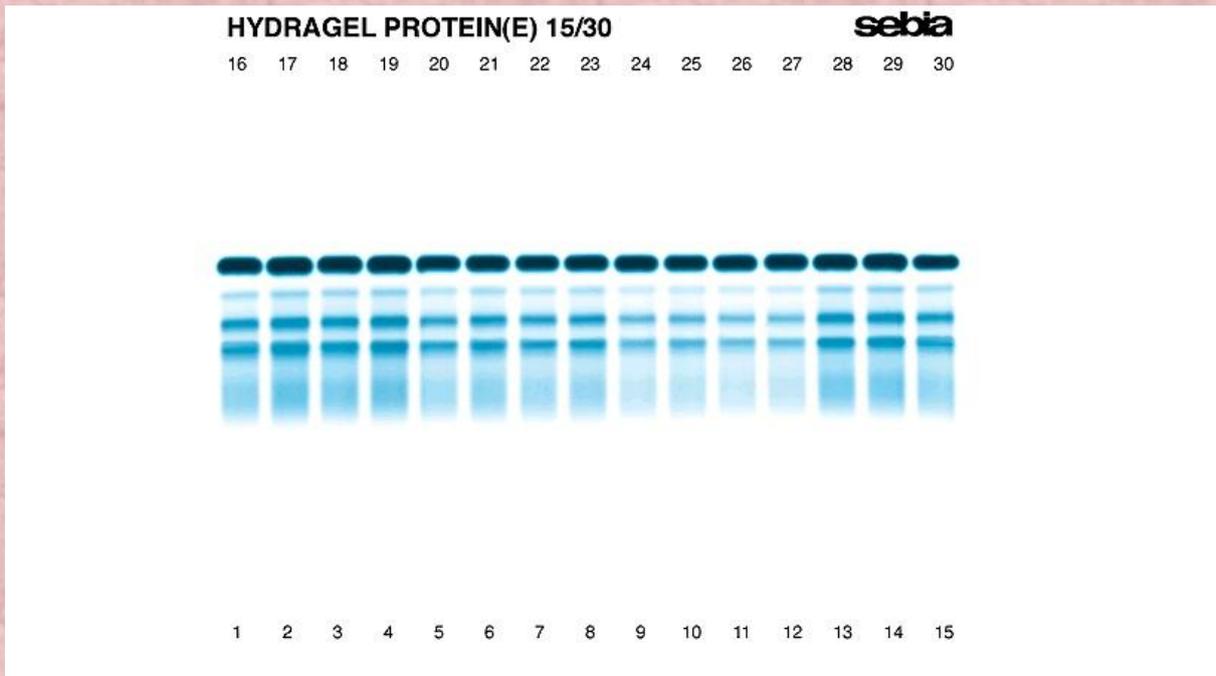


Figure: Exemple d'une plaque d'électrophorèse des protéines sériques sur gel d'agarose

3-2 L'électrophorèse capillaire :

C'est une technique de séparation électrocinétiques réalisée dans un tube de faible diamètre rempli d'un électrolyte. Le capillaire utilisé est ouvert à ses deux extrémités. Ces dernières plongent dans deux réservoirs d'électrolytes .un détecteur est placé avant la sortie du capillaire .le principe de séparation est basé sur deux phénomènes majeurs : l'électro-migration et l'électro-osmose .

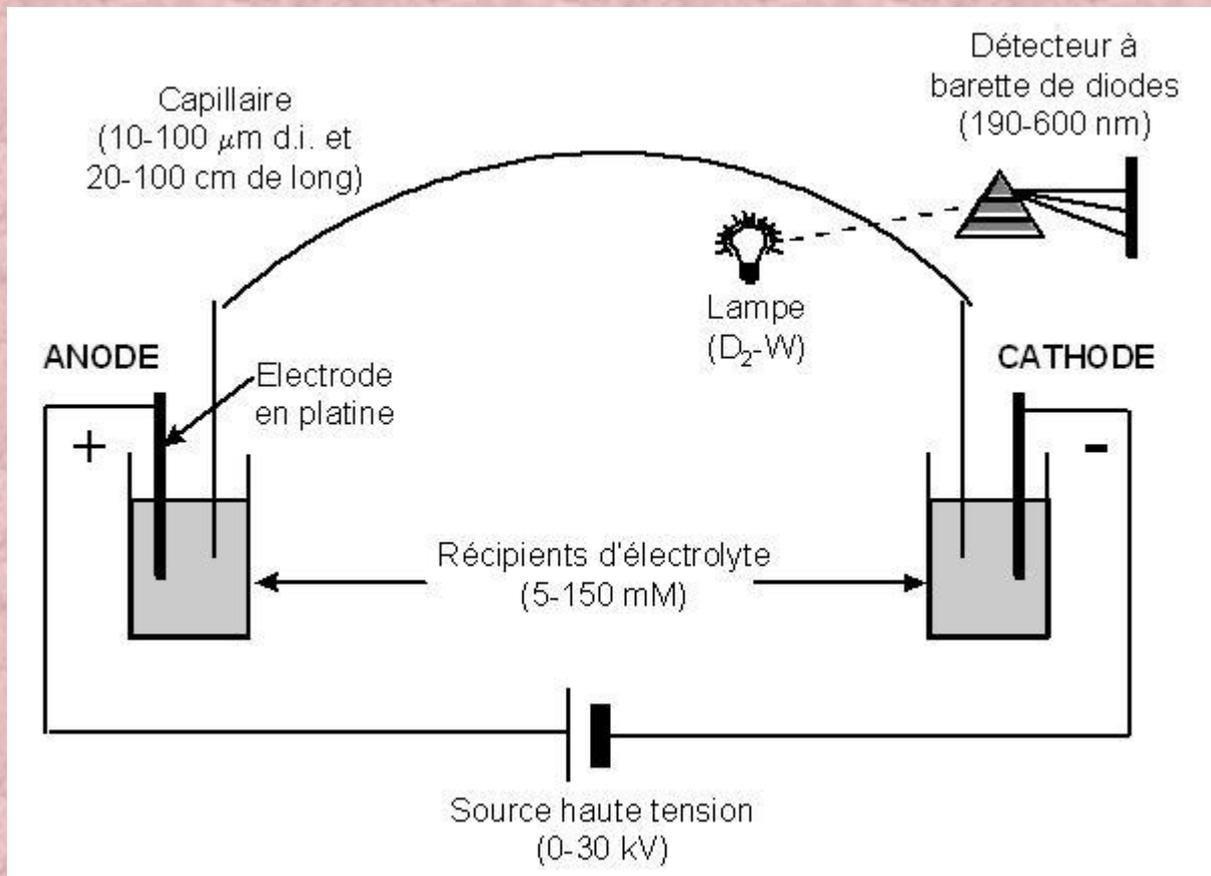


Figure : Principe de l'électrophorèse capillaire.

- **Electro migration :**

Une espèce chargée, soumise à un champ électrique (E), se déplace à une vitesse linéaire appelée vitesse électrophorétique V_e . Ainsi $V_e = m_e \cdot E$ (avec m_e la mobilité électrophorétique de l'espèce dans le milieu considéré).

Le transport des cations s'effectue dans le sens du champ électrique et celui des anions dans le sens opposé.

- **Electro osmose**

Ce phénomène résulte de l'interaction entre la solution et la paroi en silice du capillaire. Cette paroi est tapissée de groupements silanols. Ces derniers se déprotonnent à pH supérieur à deux (2). Ceci conduit à un grand nombre de charges négatives au



niveau de la paroi . Les cations de l'électrolyte viennent se placer à la surface de la silice et forment une double couche diffuse . Cette double couche de charges positives et négatives présente une différence de potentiel appelée potentiel électrocinétique ou potentiel Zeta . Dès qu'on applique un champ électrique , les cations de la double couche se mettent en mouvement vers la cathode et entraînent les molécules électrolytiques de l'échantillon : c'est le flux électro-osmotique

la vitesse électrophorétique est : $V_0 = m_0 \cdot E$ (avec m_0 : la mobilité électro-osmotique et E : le champ électrique).

le courant d'électro-endosmose est généré uniformément tout au long du capillaire et sa vitesse est indépendante du capillaire et du diamètre de la particule .

4-Valeurs sémiologiques :

4-1- Protidémie :

Le taux moyen des protéines sériques est de 65 à 80 g/l chez l'adulte sain .Pendant la grossesse , la protidémie diminue par augmentation du volume sanguin circulant . on note chez le prématuré un taux de 40 g/l mais le rapport albumine/globulines (normalement compris entre 1,2 et 1,8) est le même chez l'enfant et l'adulte . Par ailleurs , on observe des variations du taux avec l'âge , dans le sens de l'hypo-protidémie .Après un exercice modéré , la protidémie est augmentée de même que chez les athlètes entraînés et au repos.

4-2- Variations de la protidémie :

Dans le cas des protéines anormales ou de Dysprotéinémies, on distingue :

❖ Les Hyperprotidémies :

- Par augmentation de la masse protéique totale circulante :
 - Dysglobulinémies mono ou polyclonales.
 -
- Par diminution de l'eau vasculaire (hémococoncentration) :
 - Insuffisance d'apport.
 - Perte liquidienne (coup de chaleur, diarrhée, vomissement...).

❖ Les Hypoprotidémies :

- Par diminution de la masse protéique totale circulante :
 - Défaut d'apport (malnutrition).
 - Insuffisance de synthèse hépatique.
 - Déperdition protéique (cutanée rénale ou intestinale).



- Par augmentation de l'eau vasculaire (hémodilution) :
 - Surcharge hydrique

En règle générale, toute protidémie inférieure à 60 g/l ou supérieure à 80 g/l doit être complétée par une électrophorèse des protéines sériques.

4-3- L'interprétation du protéinogramme du sérum humain normal :

Les résultats de cet examen sont présentés sous deux formes :

- ❖ Un graphique (ou Protéinogramme ou protidogramme), résultat de l'intégration par lecture dans un densitomètre de la bande d'électrophorèse (voir figure)

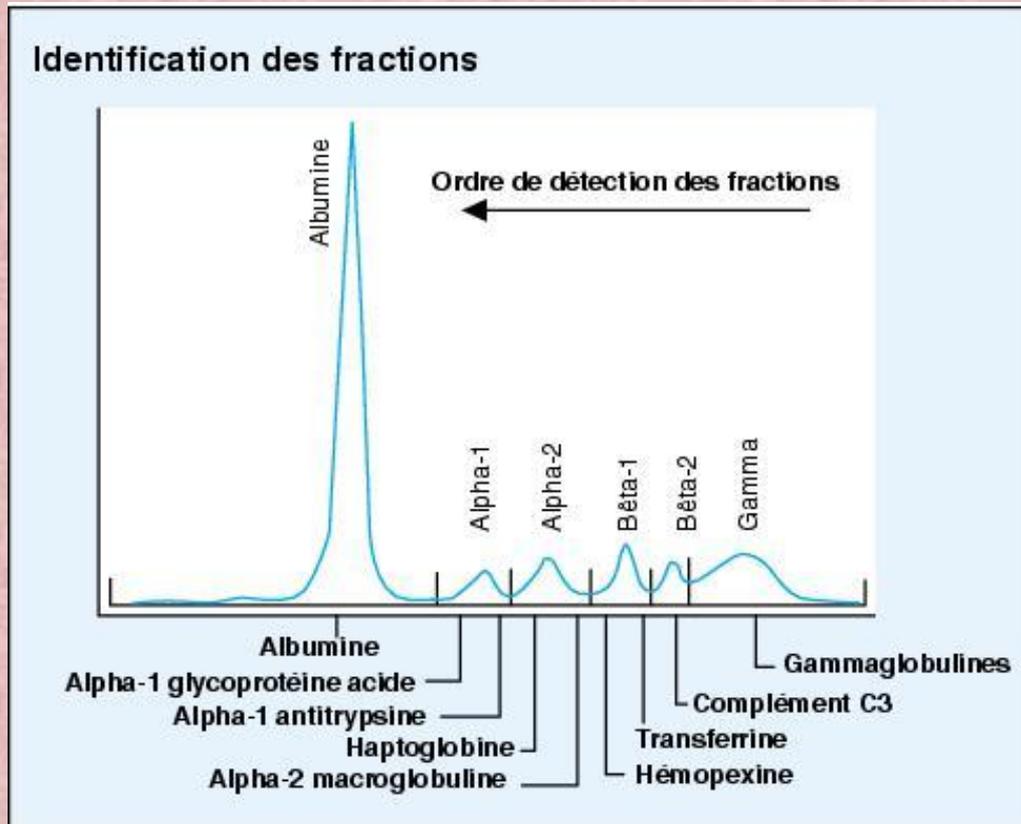


Figure : Protéinogramme sérique normale

Les protéines sériques sont séparées en six fractions principales :

- Une fraction de forte intensité, située à proximité de l'anode, est constituée d'une seule protéine : la sérum albumine.
- Les quatre fractions suivantes notées α 1, α 2, β 1 et β 2 sont chacune constituées d'un groupe divers de protéines.
- La fraction γ , fraction large de faible intensité, située à proximité de la cathode n'est pratiquement constituée que d'immunoglobulines.

❖ Des valeurs chiffrées pour chacune des fractions : pourcentage et concentration en g/l calculés à partir de la protidémie.(voir tableau)



Fractions	g/l	%
Albumine	43-51	60-71
Alpha1-globulines	1-2	1,4 - 2,7
Alpha2-globulines	5-8	7-11
Beta 1 globulines	4-6	6-9
Beta 2 globulines	1-4	2-5
Gammaglobulines	6-12	8-16

Tableau : fourchettes normales de différentes fractions des protéines sériques .

- Si la protidémie est normale , les renseignements sont fournis par des valeurs exprimées en g/l.
- Si la protidémie est anormale ,il est nécessaire d'étudier les pourcentages de chaque fraction afin de voir si la variation de la protidémie est due à une modification du taux de toutes les fractions ou seulement de l'une d'entre elles .

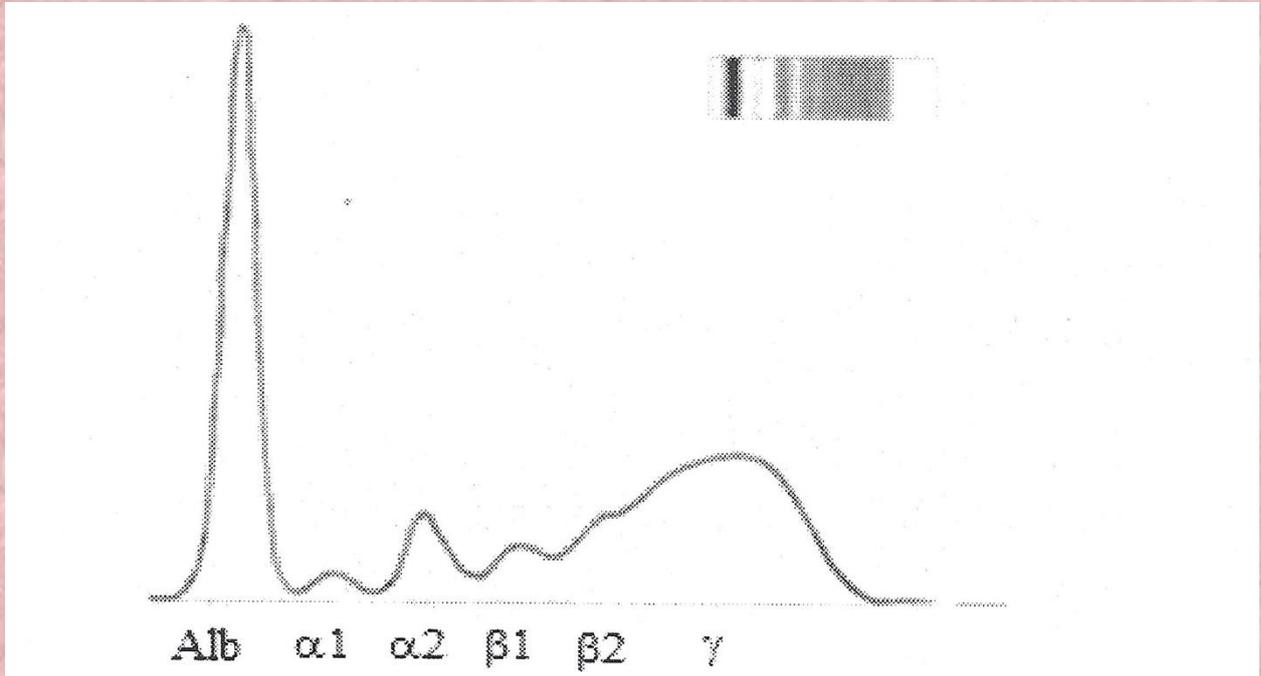
4-4- Interprétation illustrée des principaux profils électrophorétiques anormaux :

Les différents profils rencontrés lors d'interprétation d'un protéinogramme

A-Bloc bêta gamma :

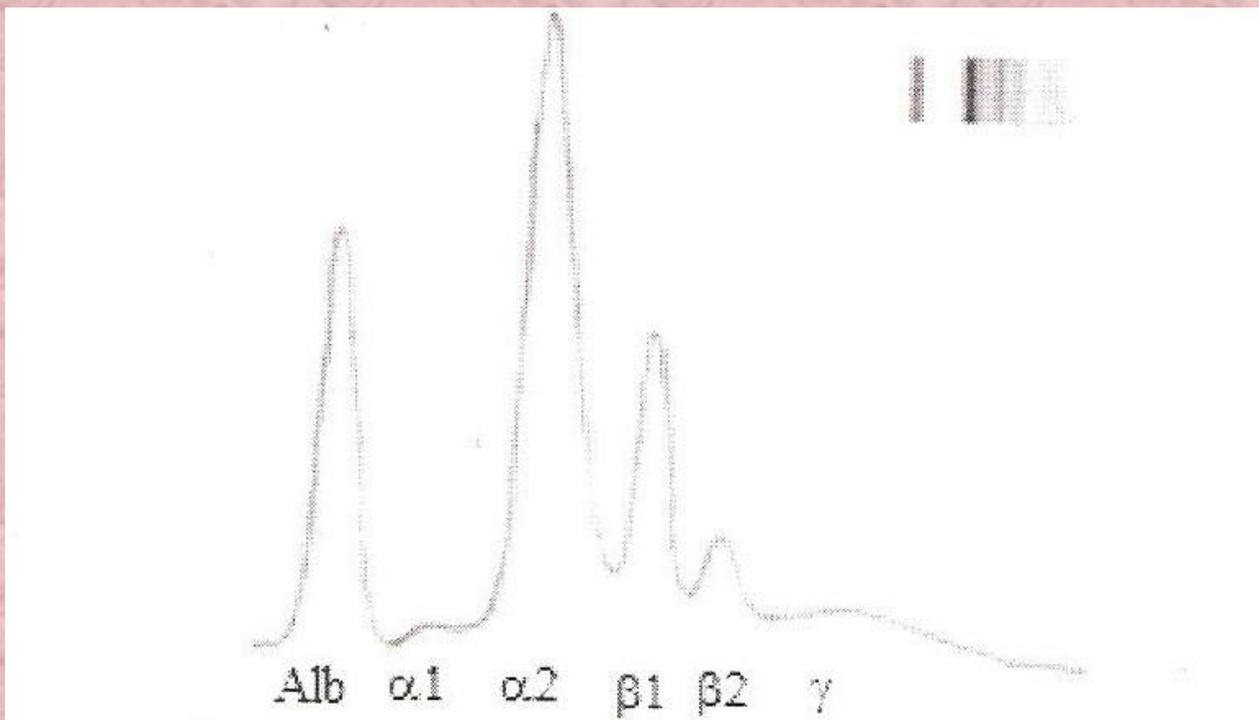
Le profil électrophorétique montre une fusion des fractions bêta et gamma (bloc bêta gamma) avec un aspect en ' dos de chameau ', liée à l'augmentation de la synthèse des IgA et des IgM , qui dépasse celle des IgG et qui se positionne à l'électrophorèse dans la zone entre bêta et gamma globulines . Ce profil peut expliquer les pathologies suivantes :

- Hépatites chroniques Virales.
- Hépatites médicamenteuses.
- Cirrhose alcoolique ou cirrhose à un stade avancé.



Bloc bêta gamma

B- Le syndrome néphrotique :



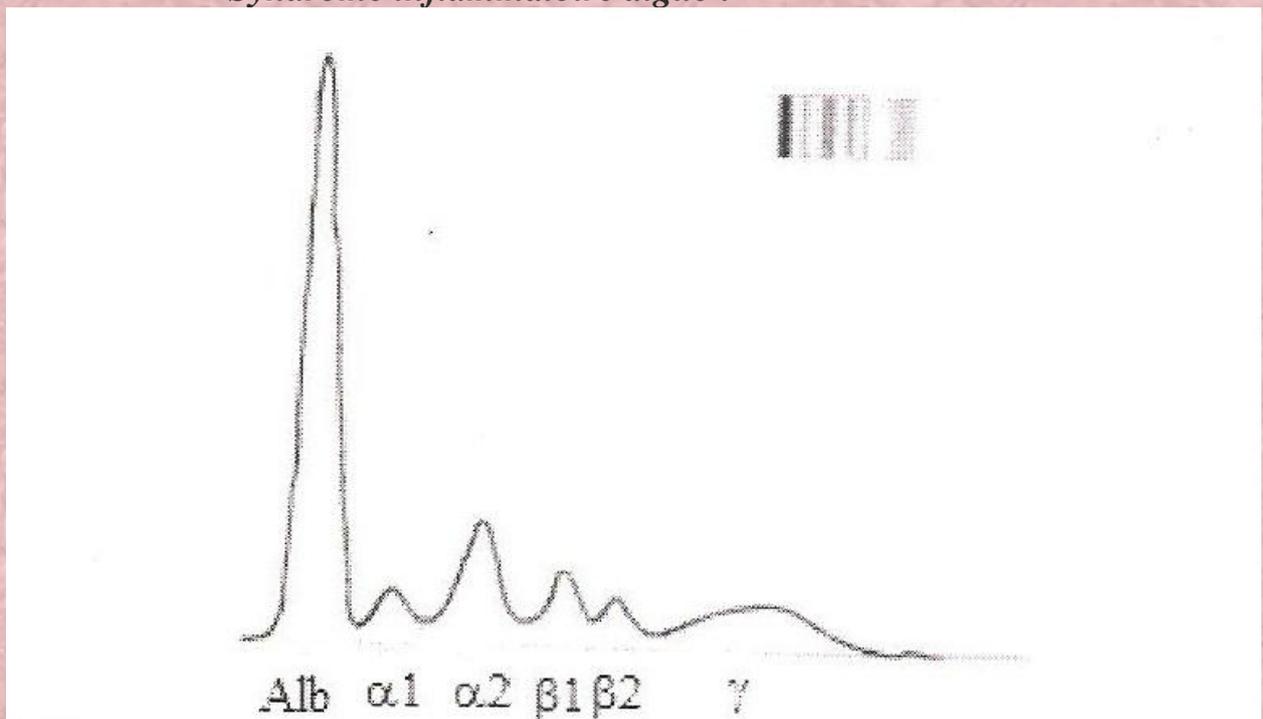


Hyper alpha 2 important lié à l'augmentation de l' α 2- macroglobuline , associée à une hypoprotidémie sévère due à la fuite rénale et à une protéinurie massive .Ce profil est obtenu lors :

- Une néphropathie diabétique.
- Une néphrose lipoïdique
- une lésion rénale.

C- Le syndrome inflammatoire :

Syndrome inflammatoire aiguë :

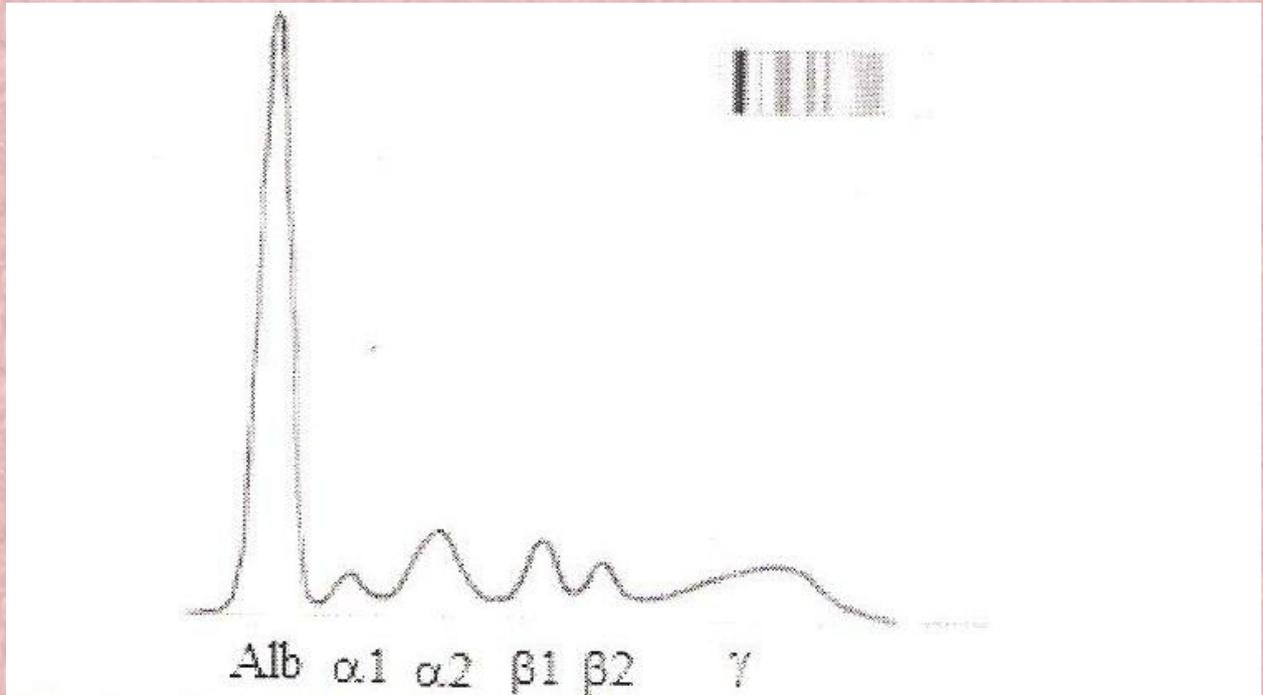


Hyper α 1 et hyper α 2 globulines, liées à l'augmentation des protéines de la réaction inflammatoire aiguë, causée par :

- une inflammation.
- une maladie infectieuse, tumorale, ou traumatique.

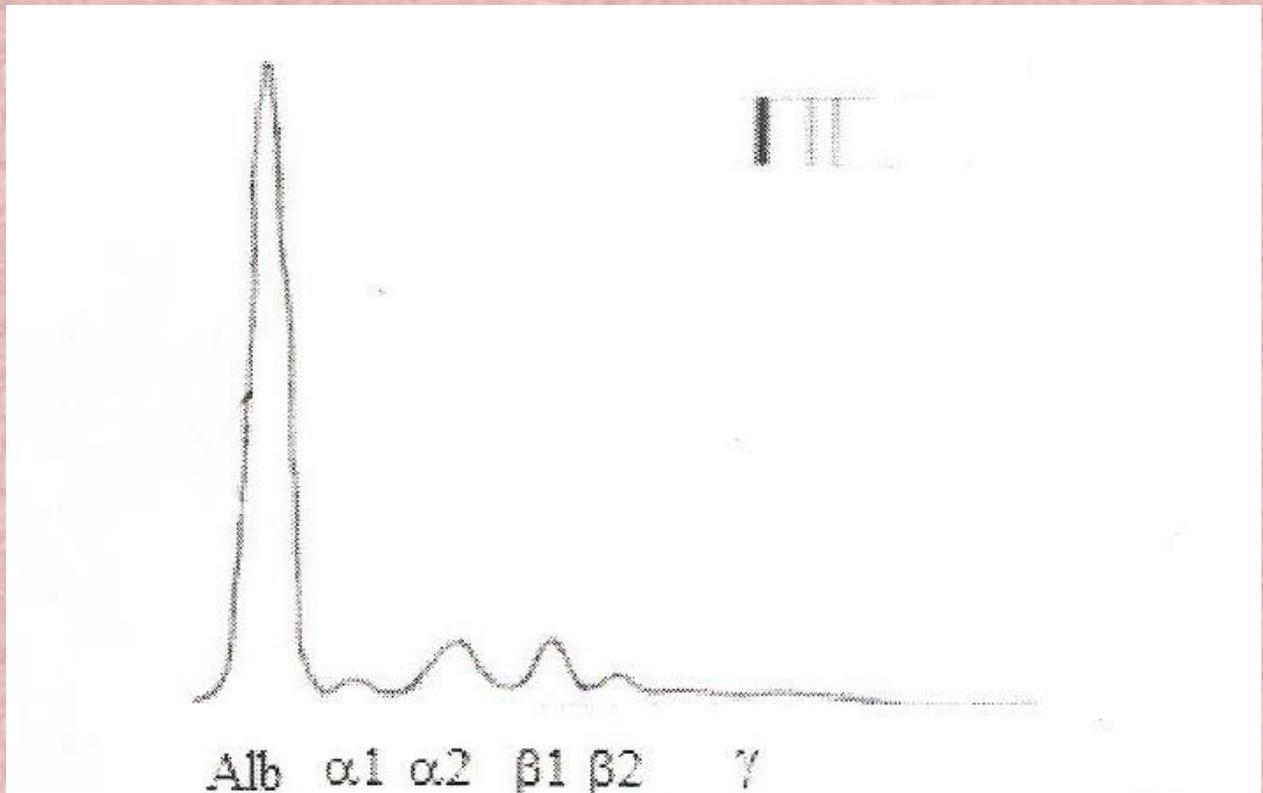


Syndrome inflammatoire chronique :



Hyper α_1 et α_2 globulines liées à l'inflammation , avec une Hypergammaglobulinémie liée à l'augmentation du taux d'immunoglobulines témoignant de la chronicité de la maladie inflammatoire .

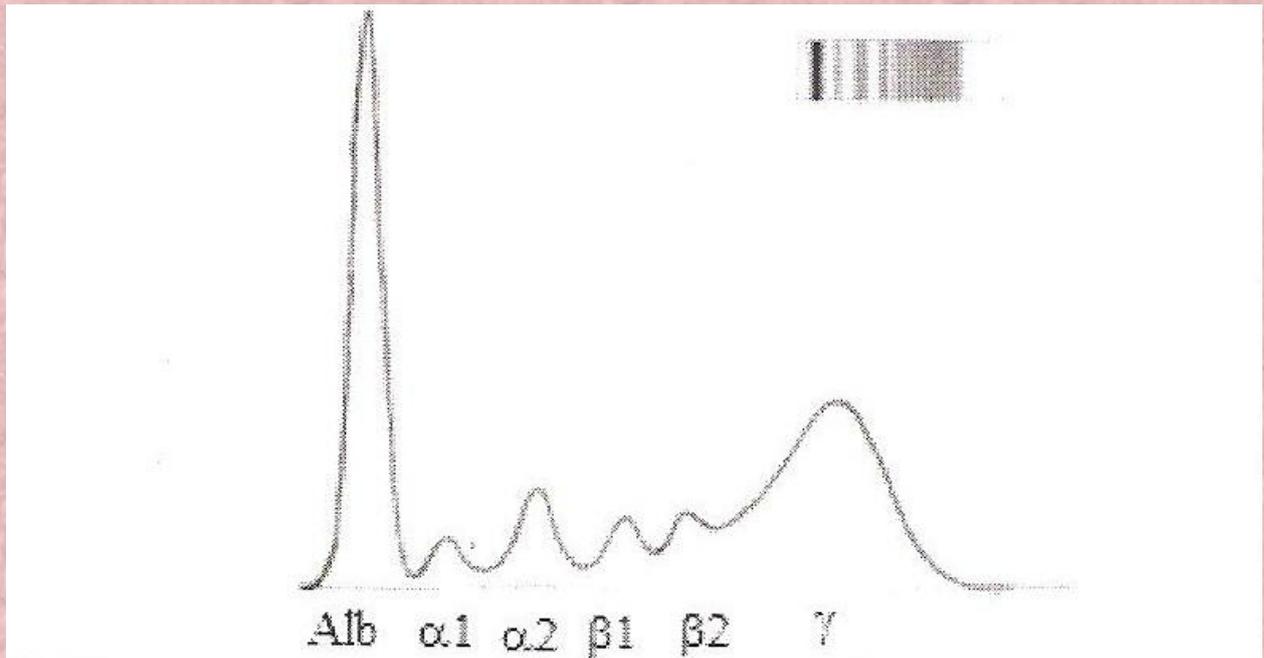
D- Hypogammaglobulinémie :



Hypogammaglobulinémie liée à une diminution congénitale ou acquise de la production des immunoglobulines , qui est causée soit par un déficit immunitaire soit par un syndrome lymphoprolifératif ou une immunosuppression acquise.



E- Hypergammaglobulinémie polyclonale :



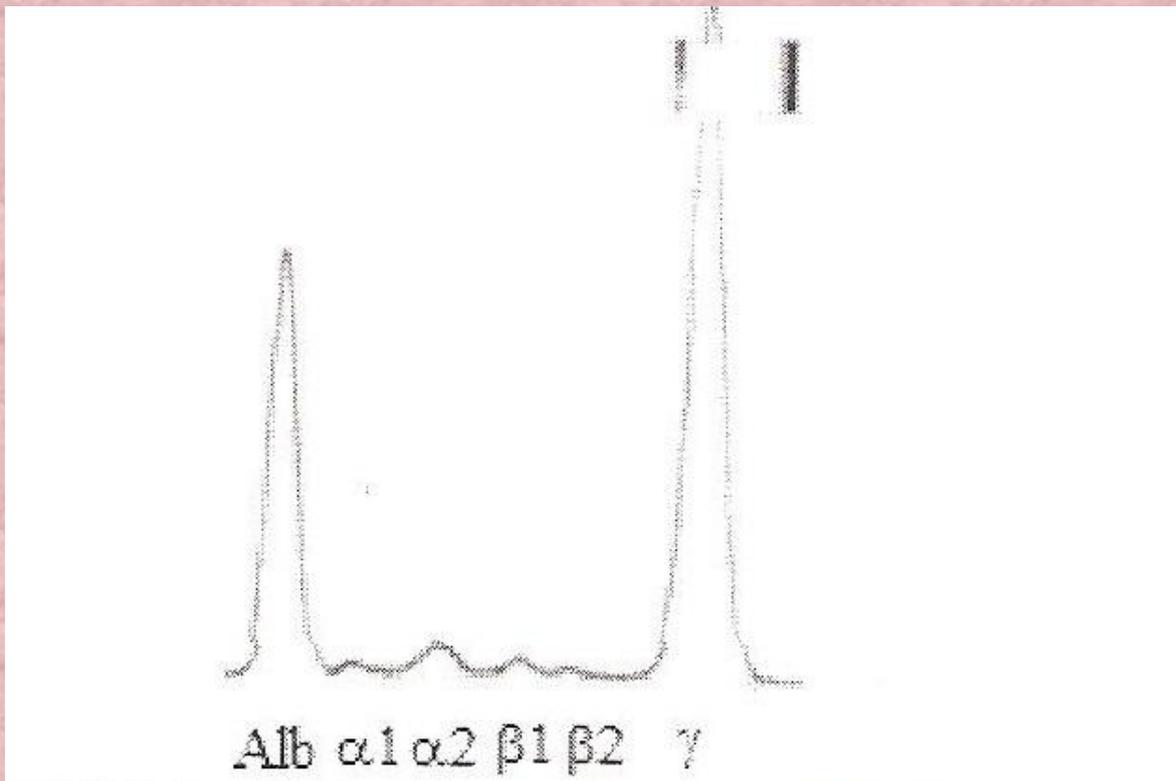
Hypergammaglobulinémie polyclonale liée à la stimulation de nombreux clones lymphocytaires B (d'où l'aspect 'en dôme' du pic).

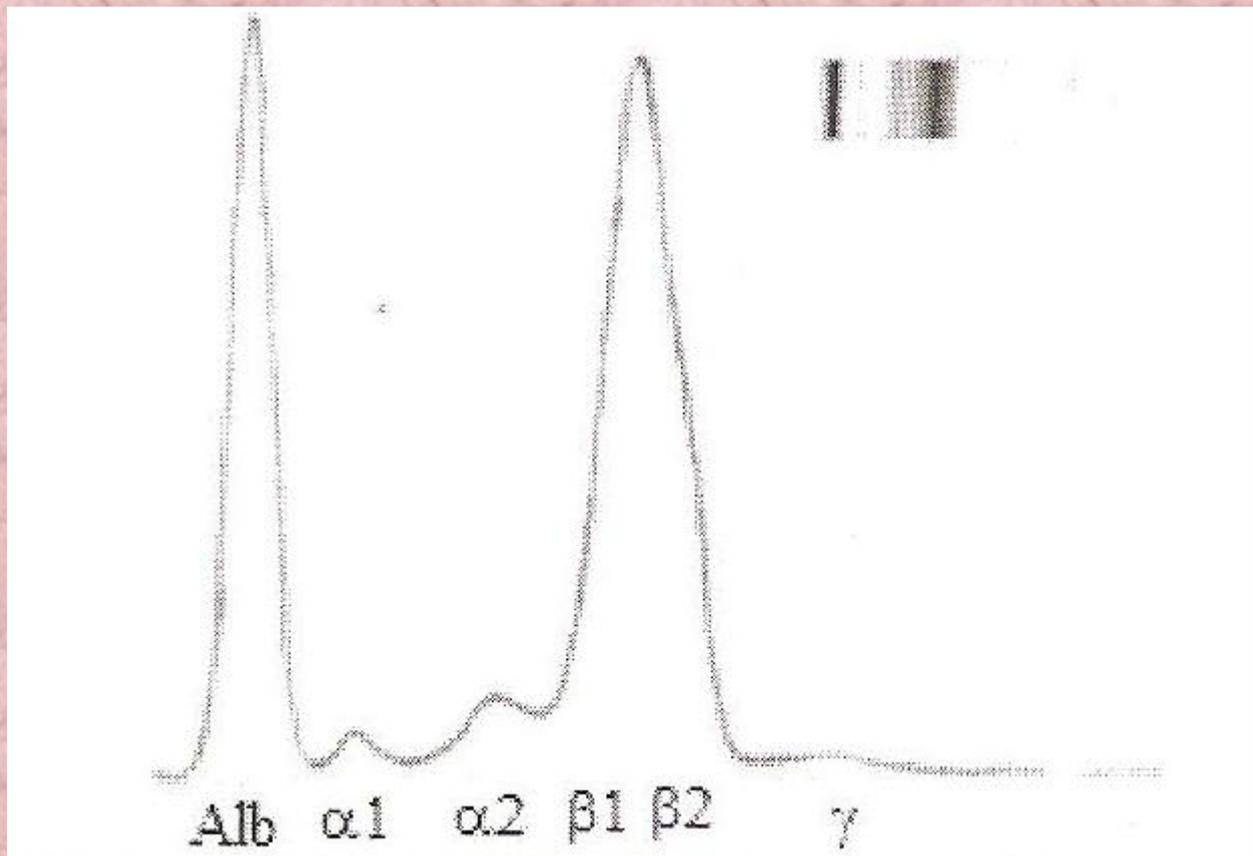
Ce profil peut expliquer les maladies suivantes :

- Une maladie infectieuse .
- Une maladie lymphatique.
- Hémopathie .
- Maladies auto-immuns...



F- Hypergammaglobulinémie monoclonale(les gammopathies monoclonale) :

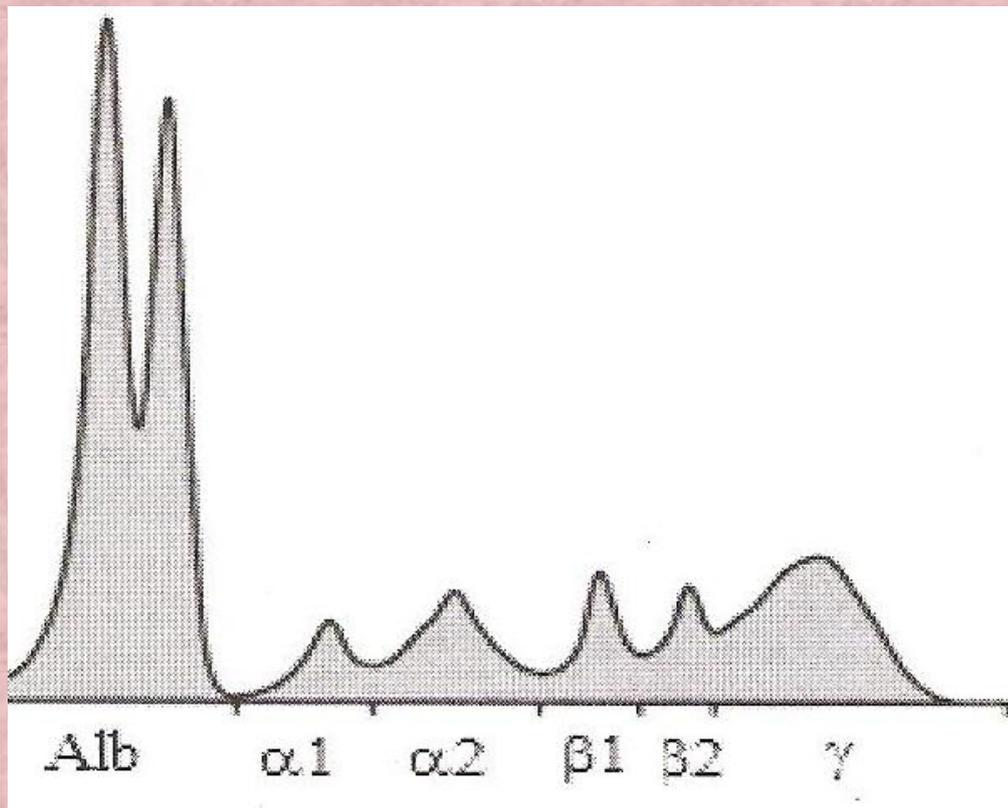




Les deux profils électrophorétiques rencontrés lors d'une gammopathie monoclonale sont : un pic à base étroite et symétrique présente soit dans la zone des gammaglobulines pour gammopathies malignes ou bénignes (un myélome multiple, une macroglobulinémie de Waldenström), d'accompagnement (une leucémie lymphoïde chronique) ou les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS, Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance).



G-Bisalbuminémie :



Dédoublement du pic d'albumine : c'est une mutation héréditaire rare, due à l'expression permanente d'un variant génétique de l'albumine, sans conséquence pathologique actuellement connue.

Ce profil est obtenu lors d'une bisalbuminémie congénitale, médicamenteuse ou associée à une pancréatite.



III -Matériel et méthode :

1-Matériel :

Deux techniques d'électrophorèse ont été étudiées : l'électrophorèse sur gel d'agarose "Hydrasys" (Sebia) et l'électrophorèse capillaire "Capillarys" (Sebia).

2-Stade pré analytique :

Ce stade commence chez le médecin prescripteur de l'analyse. L'ordonnance doit indiquer : le nom du patient, le service où il est hospitalisé, en plus des renseignements cliniques.

Enregistrement dans l'accueil (nom, numéro d'entrée dans le service)

3-Collecte des échantillons

Le prélèvement sanguin destiné à la réalisation de l'électrophorèse des protéines sériques est recueilli sur tube sec (bouchon rouge). Il est obtenu par ponction veineuse en général au pli du coude, avec garrot enlevé le plus rapidement possible. Il n'est pas indispensable d'être à jeun. L'analyse est réalisée sur sérum après centrifugation à 3000 tours par minute pendant 10 min.



Figure :Tube sec à prélèvement (vacuette)

4-L'électrophorèse capillaire :



C' est une technique analytique qui permet la séparation et la quantification de nombreux paramètres biologiques dont les protéines sériques. Cette méthode de séparation est considérée comme très performante (en particulier sur le plan de la résolution), rapide et reproductible, offrant en outre l'avantage d'une automatisation complète de l'analyse.

Le principe utilisé est celui de l'électrophorèse capillaire en solution libre permettant la séparation de molécules chargées en fonction de leur mobilité électrophorétique propre dans un tampon de pH constant et de flux électro-osmotique plus ou moins important. Le système Capillarys comprend huit capillaires en parallèle, permettant huit analyses simultanées.

Sur ce système, l'injection des échantillons (dilués au 1/10 dans le tampon) dans les capillaires, est effectuée à l'anode par aspiration. La séparation est ensuite réalisée en appliquant une différence de potentiel constante de 9 000 V aux extrémités de chaque capillaire (thermostaté à 35 °C). La détection directe des protéines est effectuée à 200 nm côté cathode. Les capillaires sont ensuite lavés par une solution de lavage, puis par le tampon d'analyse. Avec le tampon basique utilisé, six fractions sont séparées dans l'ordre suivant : γ -globulines, β 1- et β 2-globulines, α 1- et α 2-globulines et albumine.

La composition du kit de réactif " Capillarys" comprend un tampon d'analyse à pH = 10, une solution de lavage concentrée contenant de la soude caustique, des barrettes de dilution à usage unique pour la dilution des échantillons du sérum par l'automate et des filtres à usage unique pour les flacons de réactifs.

5- L'électrophorèse sur gel d'agarose "Hydrasys" :

C'est une technique semi-automatisée permettant la migration et la séparation des protéines sériques en tampon alcalin (pH = 9,2) sur un gel d'agarose (Hydragel protéine 15/30 ou Hydragel protéine 54).

Les protéines sont séparées en cinq fractions : albumine, α 1- et α 2-globulines, β -globulines et γ -globulines.



Ces protéines séparées sont colorées par une solution d'amidoschwarz et l'excès de colorant est éliminé en milieu acide.

La densitométrie (à 570 nm) donne une quantification relative précise de chaque zone individualisée.

Le système "Hydrasys" comporte les étapes suivantes : application des échantillons non dilués, migration électrophorétique à 20 W constants, séchage, coloration, décoloration, séchage final et lecture sur un densitomètre/scanner à 570 nm.

La composition du kit des réactifs "Hydragel" protéines comprend des mèches tamponnées (jouant un rôle de réservoir de tampon pour l'électrophorèse et assurant le contact entre le gel et les électrodes), du colorant amidoschwarz (solution acide à pH = 2 ; à 4 g/l), de l'éthylène glycol (6,7 %), des applicateurs, des papiers filtres et 10 gels d'agarose prêts à l'emploi.

Chaque gel contient 8 g/l d'agarose et du tampon Tris-barbital à pH = 9,2.

Les autres réactifs nécessaires sont une solution de décolorant contenant 0,5 g/L d'acide citrique (à diluer au 1/1 000 avec de l'eau distillée), une solution de lavage "Hydrasys" (tampon alcalin, pH = 8,8 et azoture de sodium 0,625 %) et du Fluidil pour le traitement d'échantillons visqueux ou troubles.

Les immunofixations sont réalisées sur des gels "Hydragel 4 IF Sebia".

Chaque gel contient : 8 g/l d'agarose et du tampon Tris-barbital, pH = 8,8 .

La composition du kit de réactif "Hydragel 4 IF" comprend : 10 gels d'agarose, des mèches tamponnées, du colorant amidoschwarz, du colorant violet acide (2 g/l de violet acide, 10 % d'acide acétique), du diluant (tampon alcalin , pH = 8,0 , bleu de bromophénol), un coffret de fixateur et d'antisérums (contenant des immunoglobulines totales de mammifère antihumaines), des papiers-filtres.

Les autres réactifs nécessaires sont un décolorant (acide citrique : 0,5 g/l à diluer au 1/1 000 avec de l'eau distillée), une solution de lavage (tampon alcalin à pH = 8,8 et azoture de sodium : 0,625 %) et du Fluidil®.

L'immunofixation avec des anticorps pentavalents (mélange contenant des



anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG, anti-kappa et anti-lambda) est réalisée sur des gels "Hydragel 12 IF, Sebia". La composition des gels est identique aux deux techniques pré-décrites.

6-Comparaison de "Capillarys" et "Hydrasys" :

La comparaison entre Hydrasys et Capillarys montre qu'il ya une importante variation entre la mesure de la zone Alpha 1 globulines sur Hydrasys (3,28%) et sur Capillarys (5,6%) .

En effet la présence de l'acide sialique interfère dans la mesure de la fraction Alpha 1 sur Hydrasys . Les coefficients de corrélation (r)pour chaque fraction protéique avec leur degré de de signification (p) sont donnés dans le tableau suivant:

Protéines	Corrélation
Albumine	+0,81 (P<10 ⁻⁴)
Alpha 1 globulines	+0,63(P<10 ⁻⁴)
Alpha 2 globulines	+0,84(P<10 ⁻⁴)
Bêta 1 globulines	+0,88(P<0,25)
Bêta 2 globulines	+0,61(P<10 ⁻⁴)
Gamma globulines	+0,74(P<10 ⁻⁴)

On constate que presque toute les corrélations entre les deux appareils sont acceptables sauf pour la fraction des bêta 1 globulines la corrélation est peu significative (p=0,25) ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'électrophorèse capillaire permet une meilleure séparation de la zone β globulines que l'électrophorèse sur gel d'agarose .

Exemple : Calcul de la corrélation pour l'albumine :

La formule de corrélation :

$$r = \frac{\sum (X - \bar{X}) \cdot (Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2} \times \sqrt{\sum (Y - \bar{Y})^2}}$$

X barre : moyenne des X

Y barre :moyenne des Y



on représente graphiquement la corrélation de l'albumine , sur l'axe des X On va mettre le pourcentage d'albumine mesuré par « Hydrasys » , alors que sur l'axe des Y on va mettre le pourcentage d'albumine mesuré sur « Capillarys ». Voir Figure

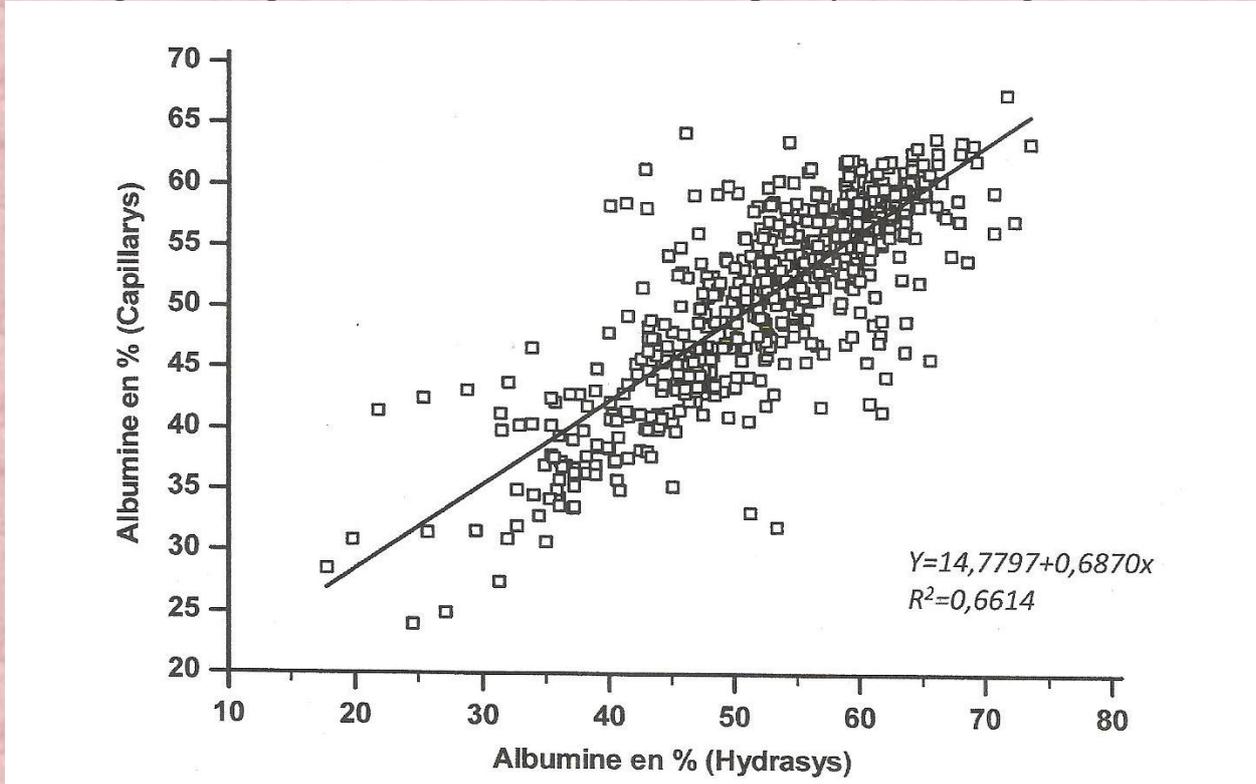


Figure : Droite de corrélation de la fraction albumine en % mesurée sur « Capillarys » et sur « Hydrasys ».

On constate une corrélation positive et statistiquement significative entre la fraction d'albumine mesurée par « Capillarys » et celle mesurée par « Hydrasys » avec un coefficient de corrélation de 0,81 ($P<10^4$)

IV- Conclusion :

L'électrophorèse des protéines sériques présente tout son intérêt dans l'information qu'elle apporte aux médecins et aux biologistes dans le diagnostic et le suivi de certaines pathologies graves .elle doit être réalisé avec soin et qualité afin de garantir des résultats fiables.



En effet l'électrophorèse capillaire sur Capillarys présente l'avantage d'être très résolutive, entièrement automatisée avec une bonne cadence, une bonne sensibilité et une facilité d'utilisation du logiciel .elle présente par contre d'inconvénient de l'absence de support d'interprétation.

L'électrophorèse sur gel d'agarose, quant à elle, présente un atout important qu'est le support d'interprétation ; par contre cette technique est semi- automatisée. Sa cadence est faible et son système d'intégration augmente le risque d'erreur.

Cependant, les biologistes affirment apprécier l'électrophorèse r sur gel d'agarose par rapport à l'électrophorèse capillaire.

Pour faire une bonne comparaison entre les deux méthodes d'électrophorèse, il fallait plus de temps, ce qui nous a pas été possible.

Références bibliographiques

- AlbanG : Département de chimie et de biologie moléculaires : cours sur les protéines plasmatiques.2006 /2007 ;
- BamouY : Support de cours de biochimie clinique/2° année médecine/faculté de médecine et de pharmacie rabat Maroc.
- Casier PH : Association française des ingénieurs biomédicaux : panorama des automates de laboratoire ITMB-RBM News 2004 ;25 :12-22 .
- Blessum c.et al : l'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. Ann biol clin 1999 ;57(6),643-657.



- Bossuyt x .et Al automated serum protein electrophoresis by cappillarys
clin chem lab med 2003 ;41 ;704-710.
- Doree D biochimieclinique page 399 ;400 ;401 ;403 ;410 ;411 ;412
- Durant R et al.inflamatory syndrome in elderly people.EMC-medicine
2005.2 :284-290.
- Thèse de pharmacie étude comparative entre "Capillarys "et "Hydrasys",
Auteur Judicaël Degla Ahouanso/ année 2010.