

L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES

L'électrophorèse peut être utilisée pour tous les liquides biologiques contenant des protéines : sérum, urines, LCR, larmes, fèces, liquide d'épanchement. Pour réaliser une électrophorèse des protéines contenues dans les urines ou dans le liquide céphalorachidien, les techniques mises en œuvre seront sensiblement différentes.

De nombreuses affections entraînent des modifications qualitatives et quantitatives des protéines sériques. Les résultats de l'électrophorèse des protéines sériques constituent donc une aide dans la démarche diagnostique du praticien. Le sérum est ainsi le liquide biologique le plus étudié par cette approche. Il existe de nombreux types d'électrophorèses parmi lesquels :

- ⇒ l'électrophorèse libre ou en veine liquide (le déplacement se réalise en milieu liquide),
- ⇒ l'électrophorèse de zone sur support (le déplacement se réalise sur un support stabilisateur), pour laquelle il existe de nombreux types de supports : papier filtre, acétate de cellulose, gel d'agarose, gel d'amidon, gel de polyacrylamide...
- ⇒ l'électrophorèse haute résolution, permettant la séparation des protéines d'une même zone électrophorétique en bandes individuelles,
- ⇒ l'électrophorèse bidimensionnelle,
- ⇒ l'immunoélectrophorèse, fondée sur les propriétés antigéniques des protéines.

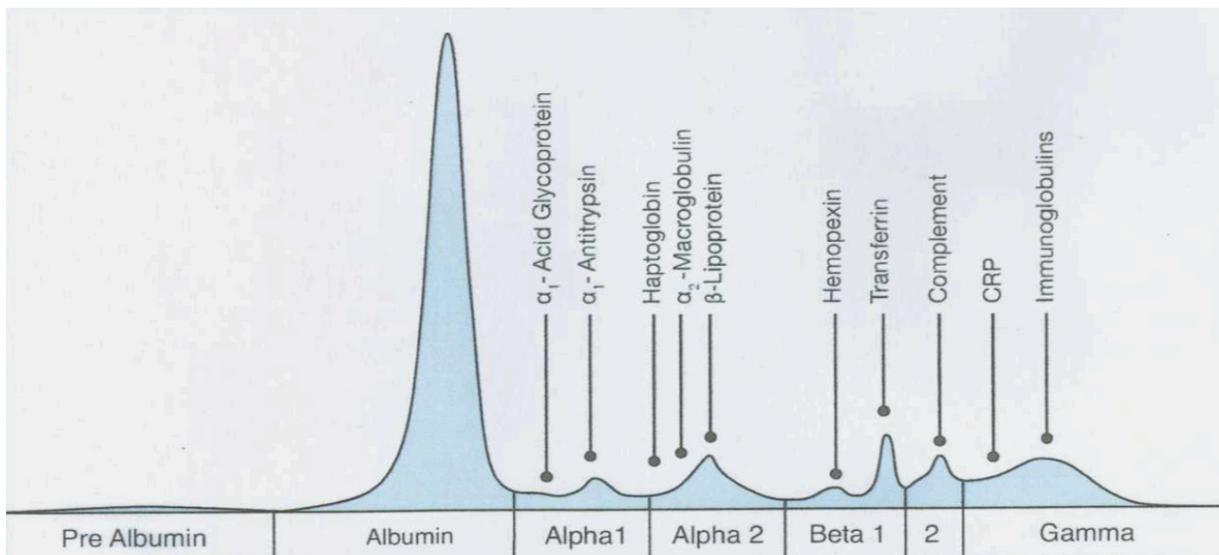
1. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les protéines sont soumises à un champ électrique dans une phase liquide. Leur séparation repose sur leurs différences de charge, de taille et de structure. La direction et la vitesse de migration des particules sont régies par la charge (négative ou positive), la taille et la structure de la protéine, l'intensité du champ électrique et la nature du support. À pH basique, la majorité des protéines sont chargées négativement (groupement COO⁻). Elles migrent de la cathode vers l'anode et vont se séparer en fractions selon leur taille (plus ou moins importante) et leur structure respective (globulaire ou non).

L'albumine portant une importante charge négative migre le plus loin. Les autres protéines forment le groupe des globulines. Les globulines forment un groupe hétérogène de protéines portant une charge négative plus faible : elles migrent moins vite que l'albumine et se séparent généralement en trois bandes différentes (α -globulines, β -globulines, γ -globulines).

Les α - globulines migrent le plus loin tandis que les γ -globulines restent proches de la ligne de dépôt.

Chez un individu sain, chaque fraction globulinique se subdivise encore en sous-fractions dont le nombre varie selon l'espèce et la technique électrophorétique utilisée. Après la migration, les protéines sont colorées (rouge ponceau, bleu de coomassie ou noir amidon en général). Une analyse densitométrique de la coloration permet d'exprimer le résultat sous la forme d'une courbe. Ce tracé est dénommé électrophorégramme ou protéinogramme. Chaque fraction est repérée sur la courbe par la présence d'un pic. L'intégration des aires sous la courbe pour chaque pic définit les quantités relatives des protéines ou groupe de protéines. Ces quantités sont exprimées en pourcentage du total. En couplant une mesure des protéines totales à ces quantités relatives, on obtient la concentration de chaque protéine ou groupe de protéines. L'aspect de l'électrophorégramme peut déjà apporter de nombreuses informations et être évocateur de certaines affections.



Protéinogramme d'allure normale montrant 7 fractions.

a. Les fractions électrophorétiques

- **L'albumine** : L'albumine est la plus abondante des protéines plasmatiques. Elle représente 45 à 55 % des protéines du sérum. C'est une protéine de grande taille, osmotiquement active, d'un poids approximatif de 69 000 daltons.
- **Les globulines** :
 - ⇒ **α globulines** : Les protéines les plus importantes des α -globulines se retrouvent majoritairement au sein des α 2-globulines avec notamment : **des**

protéines de l'inflammation : α_2 -macroglobuline, haptoglobine, céruloplasmine, et **des lipoprotéines** : High Density Lipoprotein (HDL).

⇒ **β globulines** : Les β -globulines regroupent des protéines nombreuses et variées dont les plus importantes sont **des protéines de l'inflammation** : protéine C réactive, complément, des **immunoglobulines**: IgA, IgM, et **des lipoprotéines** : Very Low Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein (LDL).

⇒ **γ globulines** : Avec des protéines d'un poids de 156 000 daltons en moyenne, la fraction des γ -globulines regroupe différentes immunoglobulines dont les plus importantes sont les immunoglobulines A, E et G.

Valeurs de référence pour les fractions protéiques chez quelques espèces animales

Serum protein electrophoresis	Dog	Cat	Cow	Sheep	Horse
Albumin (g/l)	27 - 37	27 - 41	28 - 37	26 - 36	24 - 34
Alpha globulin (g/l)	5 - 20	6 - 22	8 - 11	11 - 17	11 - 18
Beta globulin (g/l)	11 - 20	5 - 14	11 - 15	4 - 10	10 - 22
Gamma globulin (g/l)	5 - 10	12 - 20	8 - 17	19 - 33	9 - 18

b. Interprétation de l'électrophorèse des protéines sériques

Avant tout début d'interprétation, il est nécessaire de recueillir une bonne anamnèse du cas :

- concernant l'animal lui-même (espèce, âge, sexe, état physiologique),
- commémoratifs, traitements en cours, hypothèses diagnostiques,
- examen clinique lors du prélèvement (déshydratation...),
- mesure de la protidémie sérique.

Une fois ces renseignements pris, l'interprétation de l'électrophorèse se base sur l'observation du tracé, sur le rapport albumine / globulines puis sur l'étude des différentes fractions.

- Rapport albumine /globulines normal

Lorsque que le rapport albumine/globulines est normal, le tracé est très souvent normal. En effet, cela signifie que les proportions entre les différentes fractions ont été conservées. La demande d'électrophorèse fait suite dans ce cas au résultat d'une valeur anormale de la

protidémie. Le tableau ci-dessous présente les causes possibles des dysprotéinémies avec un rapport albumine/globulines normal.

Etiologie des dysprotéinémies lors de rapport albumine/globulines normal

Protidémie	Etiologie
Augmentée	<ul style="list-style-type: none"> • Déshydratation
Diminuée	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperhydratation • Hémorragie • Fuite plasmatiques (brûlures, abrasions, lésions exsudatives, parasitisme, maladie gastro-intestinale)

On remarque l'importance de l'examen clinique et la mise en évidence de la déshydratation de l'animal. Une mesure de l'hématocrite et des protéines totales permet d'identifier une anomalie de l'hydratation ou une hémorragie.

- Rapport albumine/globulines bas

Ce cas est le plus couramment observé en clinique. Il a pour origine soit une diminution de l'albumine soit une augmentation des globulines. Le tableau ci-dessous présente les causes possibles des dysprotéinémies avec un rapport albumine/globulines diminué.

Etiologie des dysprotéinémies lors de rapport albumine/globulines diminué

Origines	Causes	Etiologie
Albumine diminuée	Pertes sélectives	<ul style="list-style-type: none"> • Glomérulonéphrite • Syndrome néphrotique • Maladie gastro-intestinale • Parasitisme • Maladie chronique du foie
	Défaut de synthèse	<ul style="list-style-type: none"> • Malnutrition • Maladie inflammatoire chronique
Globulines augmentées	$\alpha 1$ -globulines augmentées	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie inflammatoire aiguë
	$\alpha 2$ -globulines augmentées	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie inflammatoire aiguë • Hépatite aiguë • Néphrite aiguë • Syndrome néphrotique
	β -globulines augmentées	<ul style="list-style-type: none"> • Hépatite aiguë • Syndrome néphrotique • Dermatite suppurative
	Pont β - γ	<ul style="list-style-type: none"> • Hépatite chronique (cirrhose)
	γ -globulines augmentées avec un pic large (polyclonal)	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie inflammatoire chronique • Infection • Hépatite chronique • Abscès hépatique • Maladie suppurative (dermatite, tuberculose) • Maladie auto-immune (anémie hémolytique, thrombocytopénie, anémie infectieuse équine, lupus érythémateux disséminé, polyarthrite, glomérulonéphrite) • Lymphosarcome
	γ -globulines augmentées avec un pic étroit (monoclonal)	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphosarcome • Myélome multiple • Macroglobulinémie • Ehrlichiose

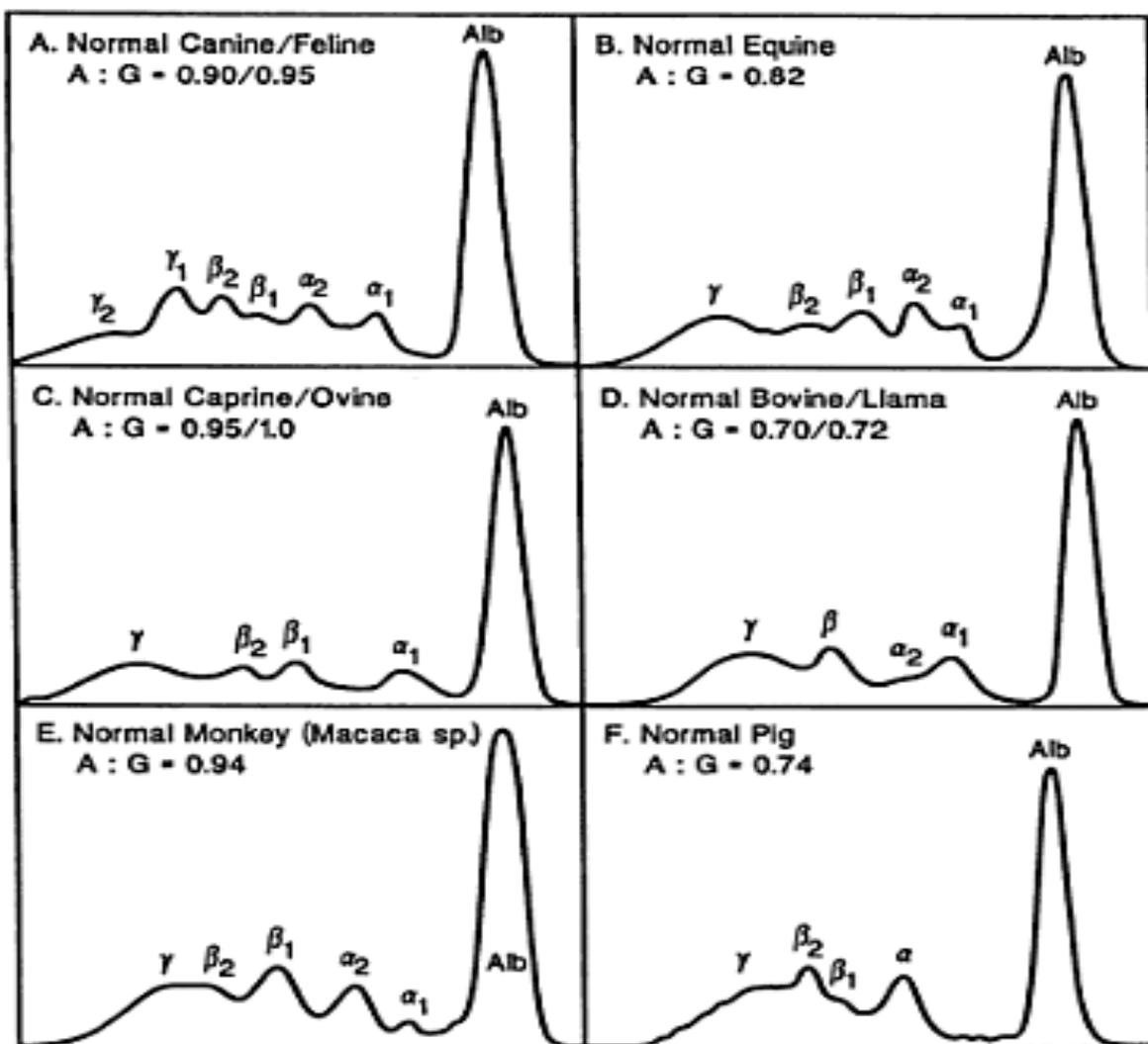
- **Rapport albumine/globulines élevé**

Ce cas est plus rare. Il a pour origine soit une augmentation de l'albumine soit une diminution des globulines. Le tableau ci-dessous présente les causes les plus fréquentes des dysprotéinémies avec un rapport albumine/globulines augmenté.

Etiologie des dysprotéinémies lors de rapport albumine/globulines augmenté

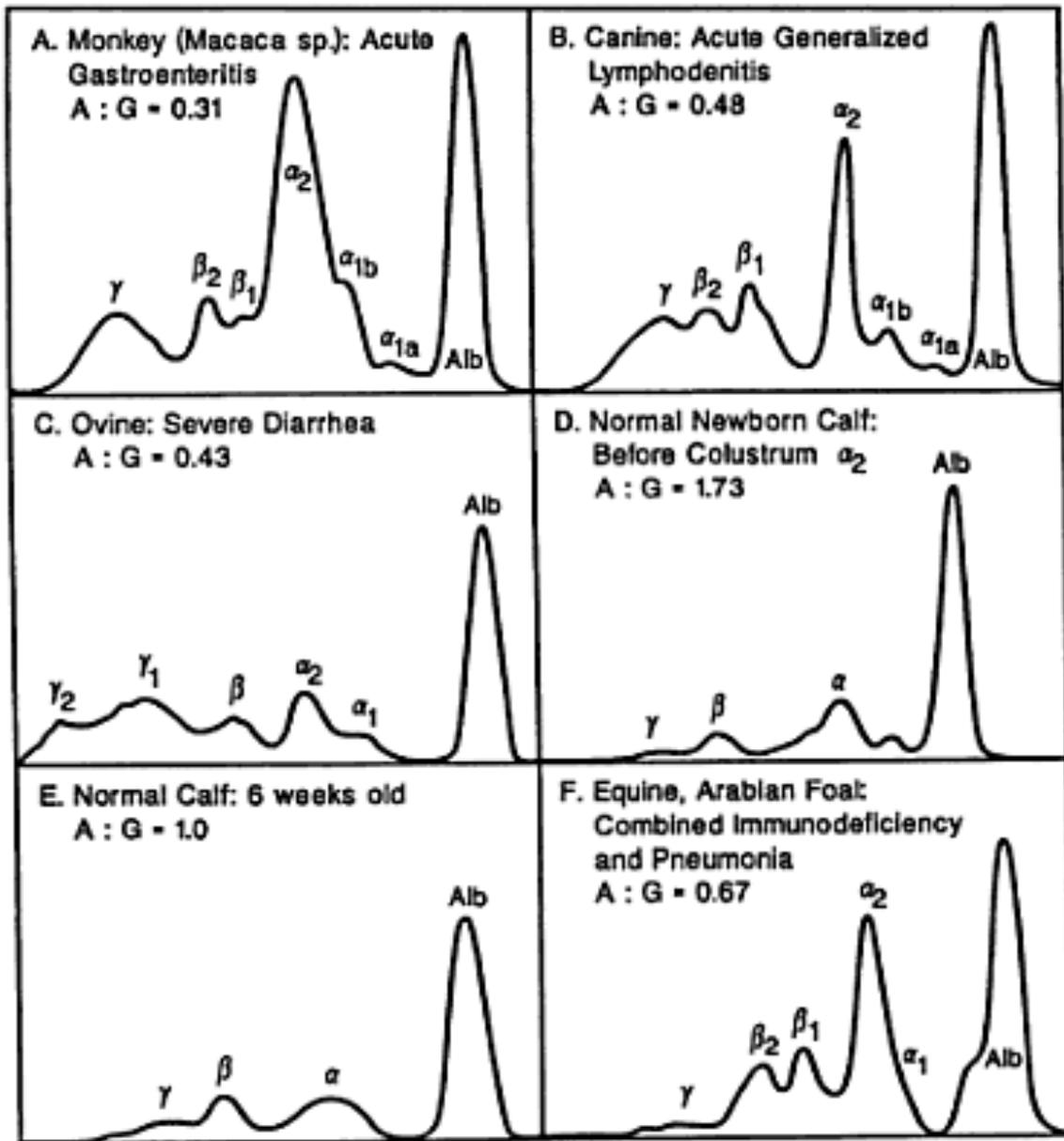
Origines	Etiologie
Globulines diminuées (γ -globulines diminuées)	<ul style="list-style-type: none"> • Nouveau-né avant la prise du colostrum • Immunodéficience du poulain arabe • Agammaglobulinémie acquise ou héréditaire

c. Exemples de profils électrophorétiques normaux

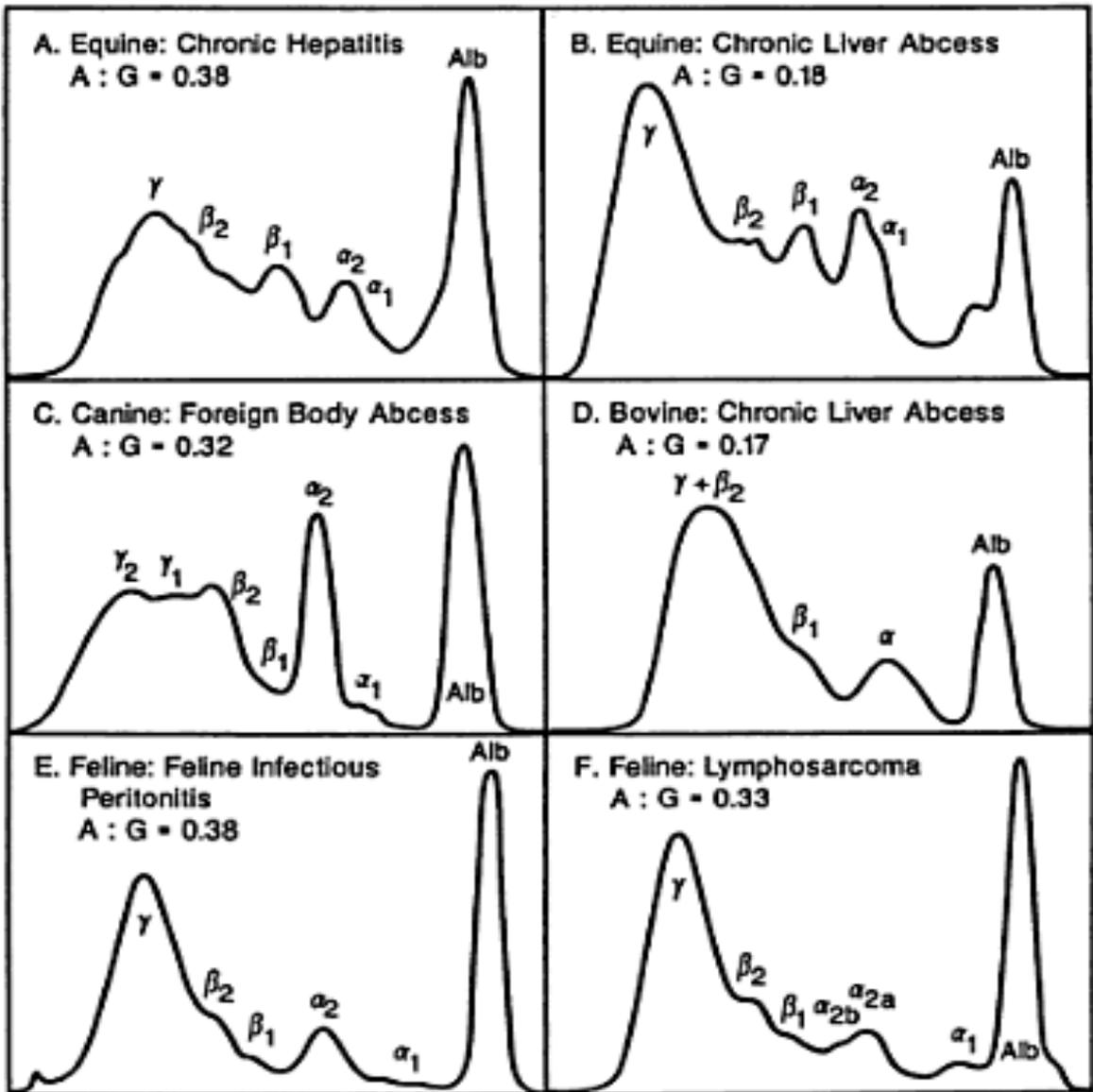


Electrophorégrammes normaux sur Acétate de Cellulose des protéines sériques de certains animaux adultes. Les ratios albumine/globulines sont dans les valeurs de références normales pour ces animaux.

d. Exemples de profils électrophorétiques pathologiques

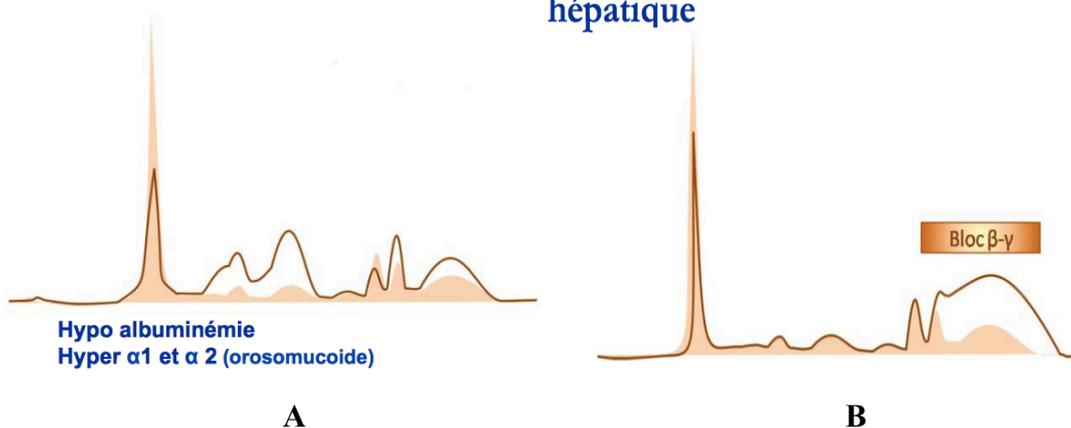


Electrophorégrammes sur Acétate de Cellulose des protéines sériques en cas de maladie inflammatoire aigue avec augmentation des protéines positives de l'inflammation (A,B,F), pertes gastro intestinales de l'albumine (C), nouveau-nés et jeunes veaux (D,E), et immunodéficience chez un poulain (F).



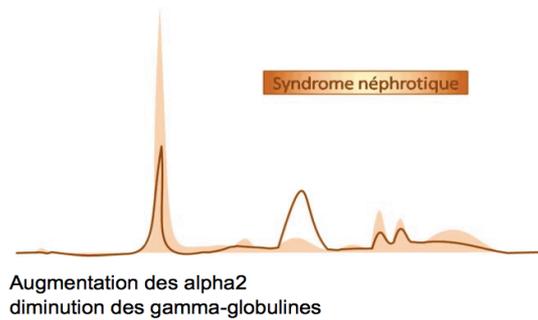
Electrophorégrammes sur Acétate de Cellulose des protéines sériques de certaines gammopathies monoclonales chez les animaux. Noter que les pics de globulines sont plus larges que les pics d'albumine.

Inflammation aiguë et chronique **Interprétation quantitative: insuffisance hépatique**

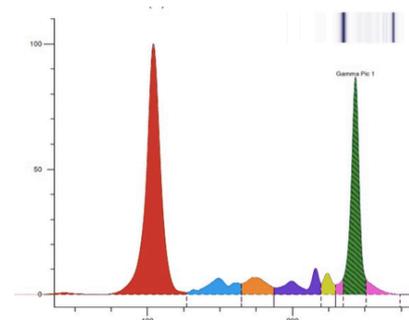


Interprétation quantitative: Syndrome néphrotique

Gammapathie monoclonale



C



D

A : hypo albuminémie, hyper α_1 , α_2 globulines dans les inflammations aiguës et chroniques.

B : au départ de l'insuffisance hépatique fusion puis bloc bêta-gamma, au fur et à mesure de l'évolution, installation d'une cirrhose irréversible, association alors d'une hypoalbuminémie par défaut de synthèse.

C : dans le syndrome néphrotique diminution de certaines fractions par fuite glomérulaire des molécules de petite taille, diminution de l'albumine, diminution de certaines Ig. Augmentation de la synthèse hépatique de macro protéines pour limiter la diminution de la pression oncotique et formation œdèmes (α_2 macroglobulines, haptoglobuline).

D : un pic détecté dans la zone des gamma doit faire évoquer une gammapathie monoclonale, c'est à dire la prolifération anormale d'un clone lymphoplasmocytaire.

e. Cas particulier des oiseaux

Chez les oiseaux, l'électrophorèse des protéines sanguines est utilisée en tant que moyen diagnostique depuis une quinzaine d'années. Son utilisation en médecine aviaire est donc beaucoup plus récente que chez les mammifères. L'électrophorèse des protéines sanguines est principalement utilisée dans le diagnostic de phénomènes inflammatoires liés à des affections bactériennes, virales ou parasitaires chez les oiseaux. Elle est donc le plus souvent réalisée sur plasma en médecine aviaire. Les plasmas sont en effet moins sujets à l'hémolyse que les sérums, et ils contiennent **le fibrinogène**, protéine caractéristique de la phase aiguë de l'inflammation. L'électrophorèse des protéines permet chez l'oiseau, de combler l'absence totale de techniques de dosages de protéines spécifiques de l'inflammation tels que nous les connaissons chez les mammifères (dosage de la protéine C réactive par exemple).

2. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une microtechnique destinée à l'analyse qualitative et quantitative de solutions complexes, à partir d'échantillons de très faible volume. C'est une véritable innovation technique dans le domaine de la biologie clinique ; méthode de séparation analytique très performante et parfaitement adaptée à la routine d'un laboratoire, elle est **rapide**, **quantitative**, **reproductible**, et elle permet en quelques minutes l'analyse d'un **micro échantillon** prélevé sur un tube primaire identifié.

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative récente. Elle se caractérise par un grand pouvoir de séparation, et par la possibilité de quantifier aussi bien les petites molécules que les biomolécules (protéines) difficilement séparables. Elle repose sur la migration dans un champ électrique et au contact d'un support approprié, des espèces présentes dans l'échantillon en solution, porteuses ou non d'une charge électrique globale. Le capillaire est en verre de silice de très faible diamètre (10 à 100 μm), ouvert à ses extrémités, sa paroi interne est chargée négativement, principalement par l'ionisation des groupes silanol. Ce capillaire, d'une longueur L variant entre 40 et 100 cm, est rempli d'un électrolyte tampon et soumis à un champ électrique continu. Afin de limiter l'échauffement du capillaire celui-ci doit néanmoins être placé dans une enceinte thermostatée. L'électrolyte est un mélange soigneusement filtré et dégazé. Un détecteur est placé à la distance de l'extrémité amont du capillaire près du compartiment cathodique. Le signal obtenu est à la base de l'obtention de l'électrophorégramme qui donne des renseignements sur la composition de l'échantillon, ne sont détectées que les espèces qui se dirigent vers la cathode.