

Abréviations

❖ Listes de abréviations générales :

Glycémie	Gly
Créatinine	Créa
Triglycéride	TG
HDL	Lipoprotéine de haute densité (high density lipoprotein).
LDL	Lipoprotéine de basse densité (low density lipoprotein).
ASLO	Antistreptolysine O
CRP	C-Réactive protéine
CPK	Créatine PhosphoKinase
CK MB	Créatine Kinase MB
GGT	Gamma Glutamyl Transférase
LDH	Lactate Déshydrogénase
Ig	Immunoglobuline
EPP	Electrophorèse des protéines sériques
IF	Immunofixation
k	kappa
L	Lambda

❖ Listes des abréviations des services :

Externe	EXT
Rhumatologie	RHUMATO
Dermatologie	DERMATO
Gastrologie	GASTRO
Médecine interne	MI
Néphrologie	NEPHRO
Neurologie	NEURO
Pédiatrie	PED
Cardiologie	CARDIO
Pneumologie	PNEUMO
Chirurgie	Ch
Réanimation	Réa
Urgence	URG
Endocrinologie	ENDO

SOMMAIRE

Présentation du lieu de stage.....	3
Introduction.....	5

BIBLIOGRAPHIE

I. Généralités sur les protéines sériques.....	7
1- Définition.....	7
2- Rappels sur la structure des protéines.....	7
3- Fonctions des protéines sériques.....	8
4- Le fractionnement des protéines sériques.....	9
4.1- Albumine.....	10
4.2- les globulines.....	11
4.2.1- les alpha globulines.....	11
4.2.2- les bêta globulines.....	11
4.2.3- les gammaglobulines.....	12
a) caractéristiques et propriétés générales des immunoglobulines.....	12
b) la structure des immunoglobulines.....	13
II. Généralités sur l'électrophorèse des protéines sériques.....	14
1- Historique de l'électrophorèse.....	14
2- Définition et principe.....	15
3- Interprétation d'un protéinogramme sérique.....	16
3.1- Variations physico- pathologiques de la protidémie.....	16
3.2- Interprétation d'un protéinogramme du sérum humain normal.....	17
3.3- Interprétation illustrée des principaux profils électrophorétiques anormaux.....	18
III. Immunofixation.....	23
1- Définition.....	23
2- Généralités sur les gammopathies monoclonales.....	24
2.1- Etiologies des gammopathies monoclonales.....	24
2.2- Les immunoglobulines monoclonales.....	24
3- Interprétation d'un profil d'immunofixation.....	25

MATERIELS ET METHODES

I. Le stade pré analytique.....	29
II. Le stade analytique.....	29
1- Les matériels utilisés.....	29
a) les automates utilisés.....	29
b) Composition des kits utilisés.....	29
c) Autres réactifs utilisés.....	31
2- Les techniques à réaliser.....	32
2.1- Dosage des protéines sériques.....	32
2.2- l'électrophorèse des protéines sériques.....	33
2.3- l'immunofixation.....	35
2.4- Outils statistiques.....	37

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Répartition selon le sexe des patients.....	38
2- Répartition selon l'âge des patients.....	39
3- Répartition selon les services.....	40
4- Répartition selon le profil électrophorétique.....	41
4.1- Répartition selon les profils anormaux.....	42
4.2- Répartition selon le type d'inflammation.....	43
4.3- Répartition selon les gammopathies.....	44
Discussion.....	54
Conclusion.....	56
Références bibliographiques.....	57

PRESENTATION DU LIEU DE STAGE

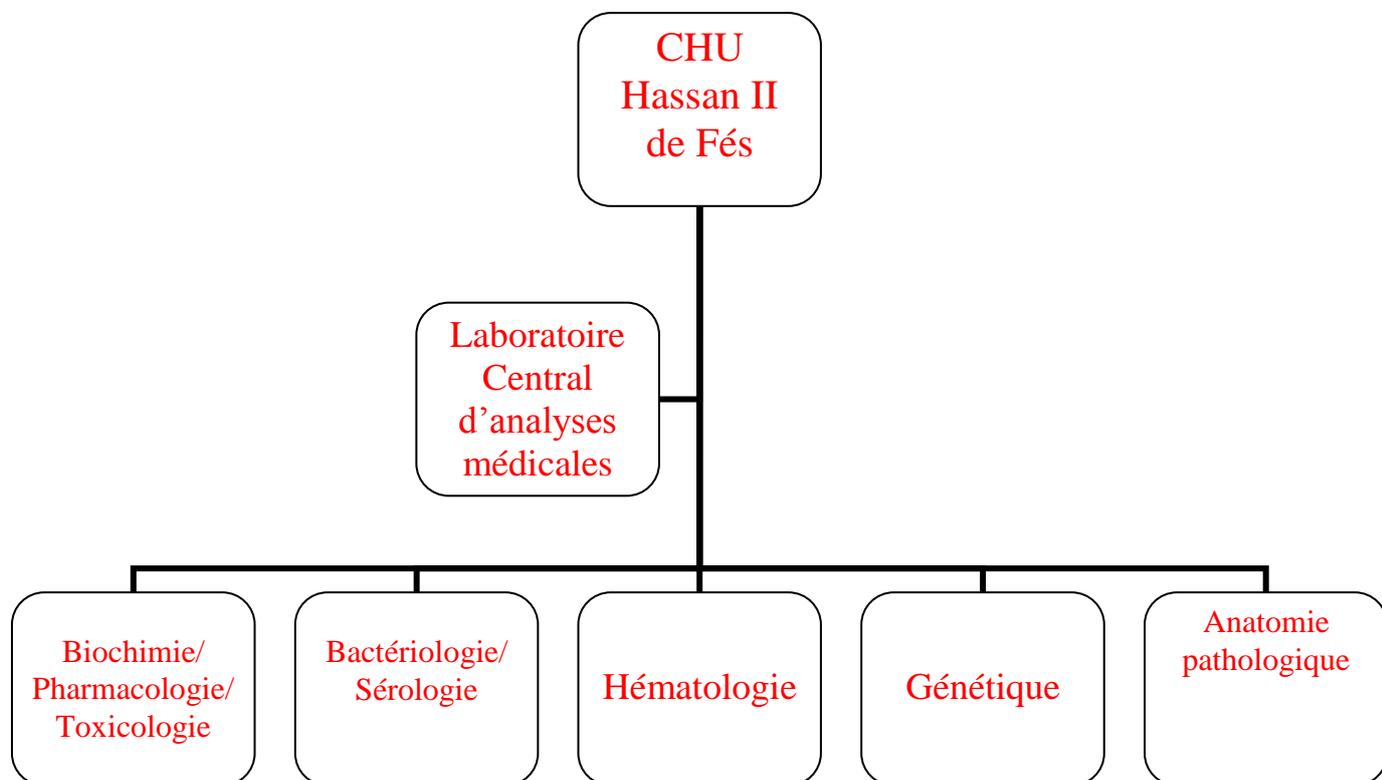
Mon stage a été effectué au sein du laboratoire central d'analyses médicales de CHU Hassan II de Fés. Ce dernier est un établissement public inauguré le 14 janvier 2009 par sa majesté le roi Mohamed VI. Il offre ses compétences en matière d'analyses médicales aussi bien aux services internes de l'hôpital qu'aux autres établissements hospitaliers de la province (hôpitaux, cabinets privés...).

Le laboratoire dispose, dans la majorité des services internes, des équipements modernes répondants aux exigences des cliniciens.

Le laboratoire est composé de cinq unités sous la responsabilité du Pr. LAMARTI AFAF responsable du laboratoire central d'analyses médicales :

- Unité de Biochimie/ Pharmacologie/ Toxicologie.
- Unité de Bactériologie/ Sérologie.
- Unité de l'Hématologie.
- Unité de Génétique.
- Unité d'Anatomie pathologique.

❖ L'organigramme du laboratoire de CHU Hassan II de Fés.



Ce travail a été réalisé au sein du service de biochimie. Il constitue avec le service de pharmacologie et de toxicologie, une unité de Biochimie/ Pharmacologie/Toxicologie, sous la responsabilité de quatre docteurs scientifiques : Dr. AISSAOUI, Dr SLAOUI, Dr. IRAQUI et Dr. ATTARI, et deux médecins : Dr. ACHOUR et Dr. KHABAL. Le service emploie neuf techniciens.

Le laboratoire de biochimie est composé de trois salles :

- Une première salle de triage et de centrifugation, où est disposé l'automate « OLYMPUS AU400 » (800 analyses/ heure).
- Une deuxième salle où est mis à la disposition l'automate « OLYMPUS AU640 » (1200 analyses/ heure) et un bureau où se fait le triage et l'enregistrement des bilans.
- Une troisième salle renfermant un automate d'électrophorèse (HYDRASIS- SEBIA), une HPLC (SHIMADZU-UFLC), et une paillasse réservée aux différentes manipulations de toxicologie et pharmacologie.

Le laboratoire de Biochimie effectue aux environs d'une centaine d'analyses, à titre d'exemple on peut citer :

- ❖ L'ionogramme (glycémie, créatinine, urée, dosage de sodium, potassium, chlore, magnésium, calcium, phosphore, dosage des protéines totales...etc.).
- ❖ Le bilan lipidique (cholestérol, triglycérides, HDL, LDL).
- ❖ Le bilan hépatique (GOT, GPT, la bilirubine totale ou directe, la phosphatase alcaline...).
- ❖ Le dosage de l'acide urique.
- ❖ Le dosage d'ASLO.
- ❖ Les compléments C3 et C4.
- ❖ Les immunoglobulines (IgG, IgA, IgM).
- ❖ Fer et Ferritine.
- ❖ Albumine et Préalbumine.
- ❖ Le dosage de lactate, lipase et amylase.
- ❖ Le dosage d'hémoglobine glycosylée.
- ❖ CRP.
- ❖ Cholinestérase, créatinine kinase MB (CK MB) et Cpk.
- ❖ La protéinurie et la glycosurie de 24h.

INTRODUCTION

L'électrophorèse des protéines sériques permet la séparation des protéines en six fractions :

- Albumine.
- Alpha 1.
- Alpha 2.
- Bêta 1.
- Bêta 2.
- Gamma globulines.

Couramment utilisée en biologie clinique, cette analyse reflète l'ensemble des protéines sériques, elle apporte de nombreux renseignements aidant dans le diagnostic de certains syndromes inflammatoires, néphrotiques, cirrhotiques, et certains maladies héréditaires, auto-immunes, infections, cancers et myélomes. Elle oriente ainsi vers d'autres examens complémentaires, par exemple : Immunofixation ou dosages pondérales des immunoglobulines, bilan hématologique et exploration rénale ou digestive.

Le but de ce travail est de réaliser une étude rétrospective des données de l'électrophorèse des protéines sériques chez une population consultante au sein de l'hôpital CHU Hassan II de Fés, au cours d'une période d'une année de 2010.

Ainsi, une première partie bibliographique permettra de revenir en détail sur l'électrophorèse des protéines sériques, une deuxième partie expérimentale, permettra de connaître Le principe de cet examen et sa réalisation pratique en laboratoire, et enfin une troisième partie permettra d'exposer les conclusions tirées de cette étude.

PARTIE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

RapportGratuit.com

I. GENERALITES SUR LES PROTEINES SERIQUES.

1- DEFINITION (1)

Les protéines totales sériques représentent la somme de toutes les protéines circulant dans le sérum, et elles constituent l'un des composants principaux du sang, correspondant environ à trois cents protéines de structures et de fonctions différentes dont seulement une centaine a été purifiée. Les protéines les plus représentées en proportion sont les suivantes :

- ❖ Albumine. : plus de 50 %
- ❖ Anticorps (= Immunoglobulines): 20 % (essentiellement des IgG)
- ❖ Fibrinogène : 5 %
- ❖ Alpha 1 antitrypsine : 4 %
- ❖ Alpha 2 macroglobuline : 4 %
- ❖ Transferrine : 3 %
- ❖ Lipoprotéines (HDL et LDL) : 8 %
- ❖ Autres : 1% (hormones, enzymes...)

L'analyse des protéines totales sériques est utilisée dans le diagnostic et le traitement de différentes pathologies affectant en particulier le foie, les reins, la moelle osseuse, ainsi que d'autres troubles nutritionnels et métaboliques.

2- RAPPELS SUR LA STRUCTURE DES PROTEINES (2)

Les protéines sont des macromolécules composées d'un enchaînement linéaire d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques, chaque protéine se caractérise par sa longueur, son poids moléculaire et sa composition en acides aminés. On distingue quatre niveaux structuraux chez les protéines :

La structure primaire d'une protéine correspond à la succession linéaire des acides aminés formant entre eux des liaisons peptidiques entre la fonction acide carboxylique de l'un et la fonction amine du suivant.

La structure secondaire est caractérisée par plusieurs motifs structuraux (hélice α ; feuillet β , etc..) dont la propriété principale est de stabiliser la structure de la protéine par un caractère répétitif de liaisons (hydrogènes, électrostatiques...) intra chaîne.

La structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace. On parle de structure tridimensionnelle, ou structure 3D.

La structure quaternaire des protéines regroupe l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques - identiques ou non - par des liaisons non covalentes, mais rarement par des ponts disulfures, qui ont pour rôle de créer les liaisons inter chaîne.

Le schéma suivant regroupe les quatre structures protéiques :

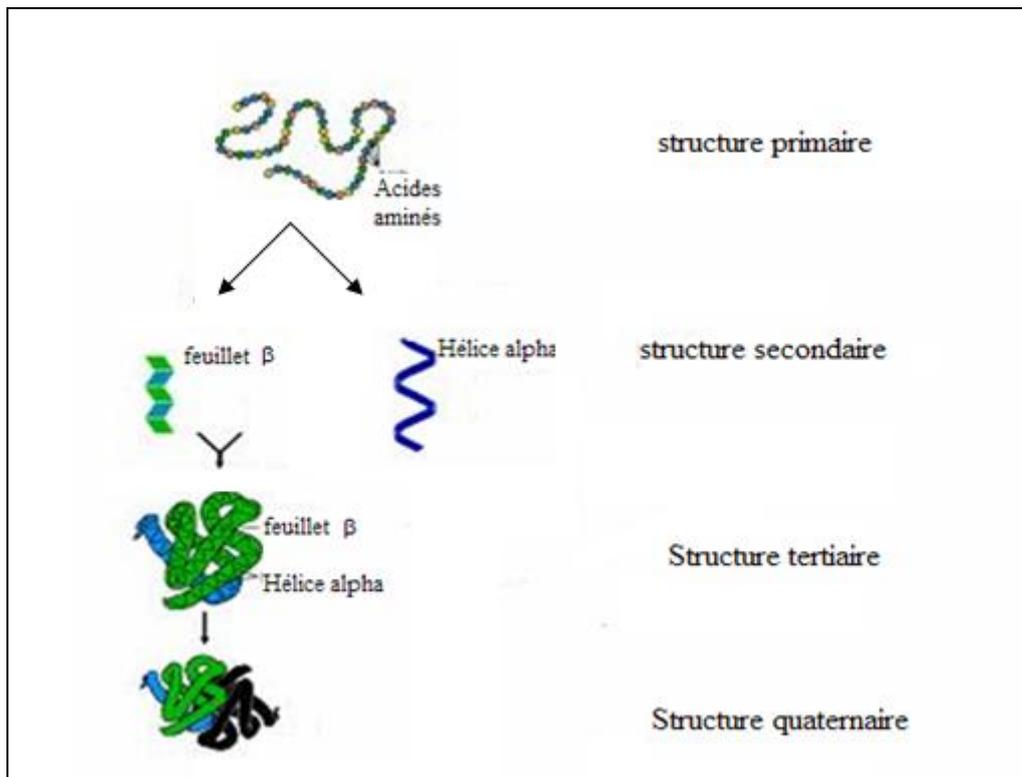


Figure 1 : les différents structures protéiques.

3- LES FONCTIONS DES PROTEINES SERIQUES

Les protéines sériques assurent plusieurs fonctions, notamment :

- La défense immunitaire ;
- Le transport de diverses substances endogènes ou exogènes ;
- Le maintien de la pression oncotique du plasma ;
- La rétention de l'eau dans les vaisseaux sanguins.

4- LE FRACTIONNEMENT DES PROTEINES SERIQUES

L'électrophorèse des protéines sériques, effectuée en milieu alcalin, permet de distinguer six fractions bien individualisées (voir figure 2).

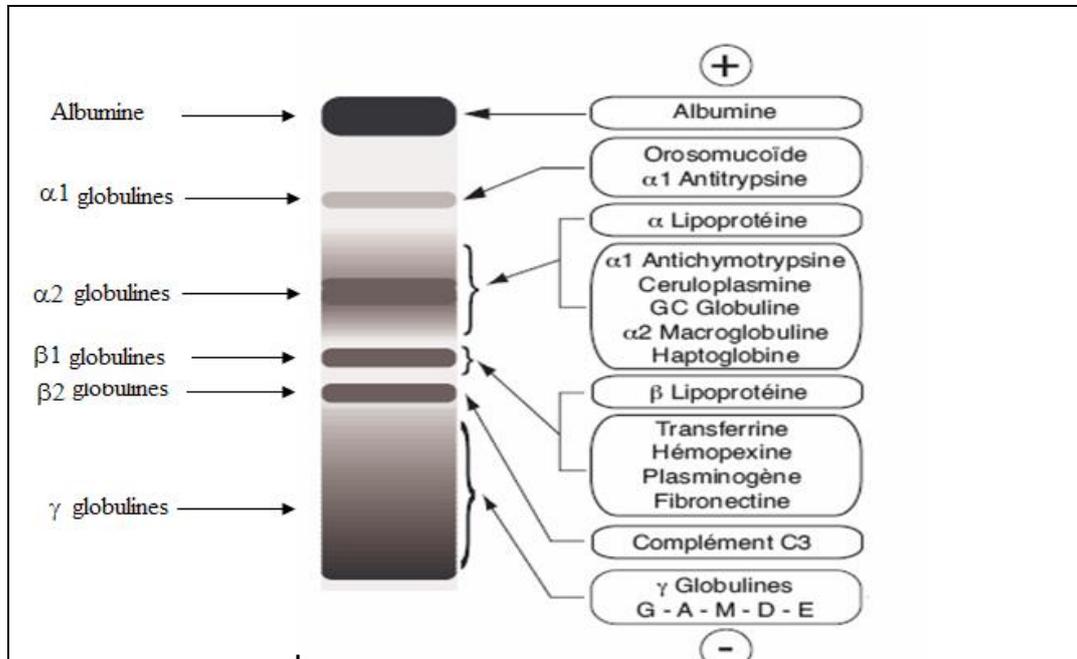


Figure 2 : Les différents fractions des protéines sériques.

- La fraction albumine biochimiquement homogène, la plus importante des protéines sériques.
- Cinq groupes de globulines de migration α1, α2, β1, β2 et γ, dont les variations quantitatives apportent de précieuses informations dans l'exploration des différents organes qui les synthétisent :
 - ❖ Le foie en ce qui concerne toutes les protéines de mobilité plus rapide que les gammaglobulines.
 - ❖ Le tissu lymphoïde en ce qui concerne les protéines de l'immunité migrant essentiellement dans la zone des gammaglobulines.

Chaque fraction comprend un ensemble de protéines généralement hétérogènes (voir tableau ci- dessous) :

<i>Fraction</i>	<i>Exemples</i>
albumine	albumine
α 1-globulines	<ul style="list-style-type: none"> • α1-lipoprotéine • α1-antitrypsine • α1-glycoprotéine acide (oroscomucoïde)
α 2-globulines	<ul style="list-style-type: none"> • α2-macroglobuline • Haptoglobine • Céruléoplasmine • α lipoprotéines
β 1-globulines	<ul style="list-style-type: none"> • transferrine • hémopéxine • Bêta lipoprotéines • Plasminogène • fibronectine
β 2-globulines	<ul style="list-style-type: none"> • complément C3
γ -globulines	<ul style="list-style-type: none"> • IgG • IgA • IgM • IgD • IgE

Tableau 1 : les protéines retrouvées dans les différents fractions du protéinogramme.

4.1-ALBUMINE (3)

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le plasma humain, elle est synthétisée 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 pHi 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 (hyperalbuminémie). Elle est provoquée par une déshydratation sévère.

➤ Alors que sa diminution (hypoalbuminémie) est causée par plusieurs facteurs :

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

4.2-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 :

4.2.1-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-globulines avec notamment :

- Des protéines de l'inflammation : α 2-macroglobuline, haptoglobine, céruléoplasmine,
- Des lipoprotéines : High Density Lipoprotein (HDL)

- L'augmentation de leur concentration plasmatique peut être causée par :
 - Syndrome inflammatoire ;
 - Syndrome néphrotique (\uparrow de alpha 2 globulines) ;
 - Diabète.
- La diminution de leur concentration plasmatique indique généralement :
 - Une Insuffisances hépatiques ;
 - Une hémolyse (haptoglobine) ;
 - Entéropathies ;
 - Une Malnutrition ou malabsorption ;
 - Déficit en α 1 antitrypsine ;
 - Fuite protéique cutanée, digestive ou rénale.

4.2.2-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.

4.2.3-les γ globulines (ou immunoglobulines) (4)

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 plasmiques et des lymphocytes B dans les tissus lymphoïdes, en réponse à une stimulation antigénique.

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

a- Caractéristiques et propriétés générales des immunoglobulines (Ig) :

On distingue 5 classes des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) qui diffèrent par leur poids moléculaire, leur charge, leur composition en acides aminés 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 IgG4 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 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 d'IgM). Elles ont 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 néfaste dans un certain type d'allergie (hypersensibilité).

b- Structure des immunoglobulines :

Malgré leur très grande hétérogénéité, toutes les Ig ont une structure de base commune, avec deux chaînes lourdes dites H (Heavy) et deux chaînes légères dites L (Light). Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures, et les chaînes légères sont unies aux chaînes lourdes par un pont disulfure très proche de l'extrémité carboxy-terminale.

Il existe 2 domaines par chaîne légère et 4 domaines par chaîne lourde. Chaque chaîne légère comporte un domaine constant CL du côté C-terminale et un domaine variable VL de l'extrémité N-terminale, tandis que les chaînes lourdes comportent trois domaines constants (CH1, CH2, CH3) et un domaine variable. Les domaines variables des chaînes légères et lourdes possèdent des zones hypervariables impliquées directement dans la liaison à l'antigène : ce sont les CDR.

Chaque Ig présente une dualité fonctionnelle :

- Une région de l'Ig intervient dans la liaison de l'antigène ;
- Une autre région est impliquée dans les fonctions effectrices.

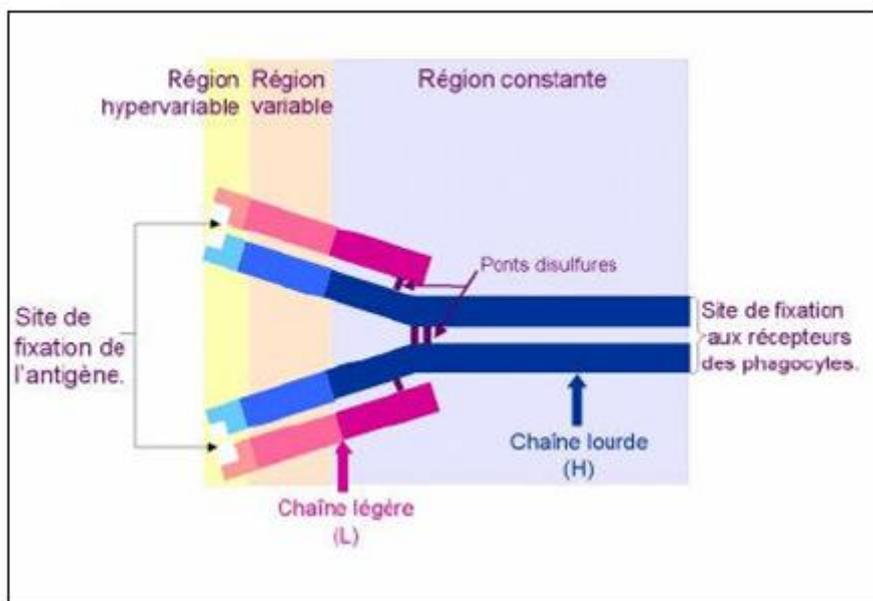


Figure3 : la structure d'immunoglobuline

Il existe trois niveaux d'hétérogénéité des Ig :

- Les isotypes : dans une espèce donnée (par exemple chez l'homme), elle définit les catégories des cinq classes principales d'Ig, ainsi que les sous classes des chaînes lourdes, et les chaînes légères.
- Les allotypes : correspondant à des variations génétiques entre individus au sein d'une même espèce. Chez l'homme, tous les allotypes sont situés sur les domaines constants des chaînes lourdes et des chaînes légères.
- Les idiotypes : sont liées à l'hypervariabilité du site de liaison à l'antigène.

- Les chaînes légères sont communes à toutes les classes d'Ig. On distingue deux types de chaînes légères : Kappa (κ) et lambda (λ).
- Les chaînes lourdes sont propres à chaque classe d'Ig. On les désigne par les cinq lettres grecques correspondant aux cinq classes d'Ig.

IgG.....Chaîne lourde gamma : γ

IgA.....Chaîne lourde alpha : α

IgM.....Chaîne lourde mu : μ

IgD.....Chaîne lourde delta : δ

IgE..... Chaîne lourde epsilon : ϵ

4.2.4- Autres protéines plasmatiques :

- Les facteurs de la coagulation (fibrinogène, facteur VIII et autres).
- Les protéines porteuses d'hormones (cortisol-binding globulin...).
- Les protéines plasmatiques libérées par les tumeurs (marqueurs tumoraux).
- Les enzymes plasmatiques.....

II. GENERALITES SUR L'ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES.

1-Historique de l'électrophorèse (5)

L'électrophorèse est une technique permettant de séparer des ions (molécule chargée positivement ou négativement) grâce à l'utilisation d'un champ électrique. Les anions (chargés négativement) migrent vers l'anode tandis que les cations (chargés positivement) migrent vers la cathode. La vitesse de migration dépend de la charge et de la taille de la molécule ainsi que des conditions de l'électrophorèse.

Cette technique a été imaginée en 1892 par S.E. Linder et H. Picton qui se sont inspirés des travaux d'Hermann Von Helmholtz sur l'électro-osmose. En effet, ce dernier constata qu'il était possible de déplacer des particules chargées sous l'effet d'un champ électrique.

Chronologie de la mise au point de l'électrophorèse.

1937 : Arne W. K. Tiselius met au point la première électrophorèse dite libre. Grâce à cette technique, il parvient à séparer les protéines du sérum sanguin. Les protéines de charge très négative comme l'albumine sont attirées par la borne positive tandis que les protéines de charge très positive comme les globulines sont attirées par la borne négative.

1952 : Pierre Grabar élabore l'analyse immuno-électrophorétique qui permet d'analyser de manière précise des mélanges d'antigènes.

1955 : O. Smithies met au point une technique d'électrophorèse sur gel d'amidon.

1957 : Joachim Kohn sépare les différents phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose.

1969 : Beber et Osborn introduisent l'agent dénaturant SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous unités protéiques.

2-Définition et principe :

L'électrophorèse des protéines est une méthode analytique permettant le fractionnement des protéines sériques, sous l'influence d'un champ électrique.

À pH basique, toutes les protéines étant chargées négativement, migrent de la cathode vers l'anode à des vitesses différentes et se séparent en plusieurs fractions.

La direction et la vitesse de migration des particules sont régies par le type de charge de la protéine, la taille et la forme de la protéine, l'intensité du champ électrique et le type de support sur lequel se réalise la migration (acétate de cellulose, gel d'agarose).

L'électrophorèse des protéines sériques (ou protéinogramme) reste actuellement une analyse très utilisée en biologie clinique. Elle est effectuée :

- Sur support d'acétate de cellulose, suivie d'une coloration au rouge ponceau, colorant reconnu pour sa fixation linéaire sur les protéines en fonction de leur concentration ;
- Sur gel d'agarose (figure 4), suivie d'une coloration à l'amidoschwarz, qui est un colorant plus sensible que le rouge ponceau et idéale pour la détection des faibles gammopathies.

Après les différents traitements (coloration, décoloration..), les supports peuvent être évalués : qualitativement par un examen visuel ou quantitativement par une intégration densitométrique, puis conservés.

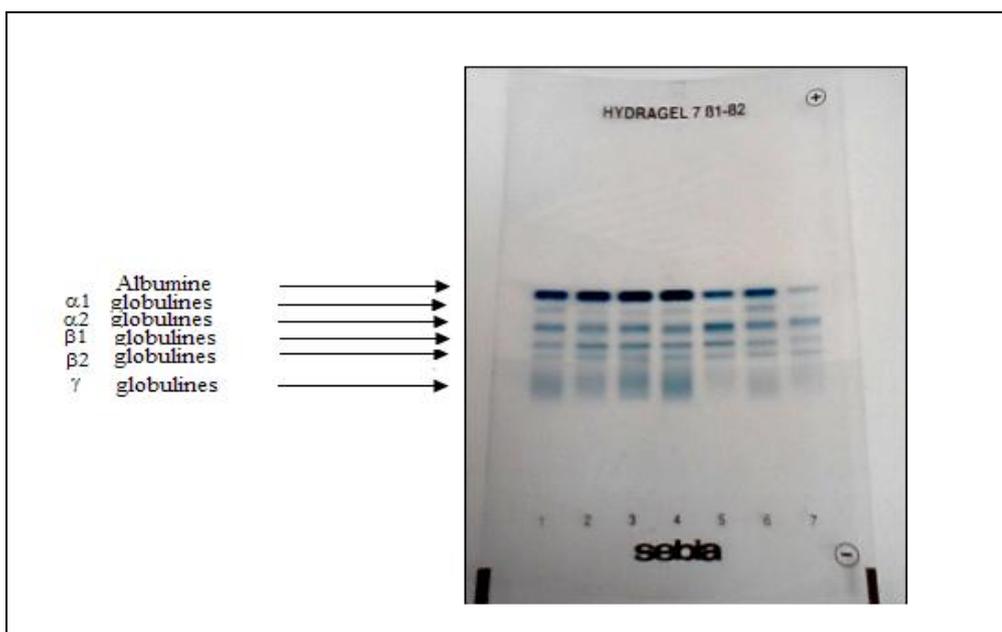


Figure 4 : Electrophorèse sur gel d'agarose.

On demande une électrophorèse des protéines sériques lorsqu'on se trouve devant :

- un taux de protides circulants élevé ;
- une élévation inexplicée de la vitesse de sédimentation ;
- des infections répétées en particulier bactériennes (recherche d'un déficit immunitaire responsable d'une hypogammaglobulinémie) ;
- des manifestations cliniques ou biologiques (une hypercalcémie, par exemple) faisant suspecter la survenue d'un myélome ou d'une hémopathie ;
- une suspicion de syndrome inflammatoire ;
- une cirrhose éventuellement.

3- L'interprétation d'un protéinogramme sérique. (6)

L'électrophorèse doit obligatoirement être complétée par le dosage quantitatif des protéines totales du sérum, car toute interprétation d'un protéinogramme suppose la connaissance des variations physico-pathologiques de la protidémie.

3.1- Les variations physiopathologiques de la protidémie.

Le taux moyen des protéines sériques est de 60 à 80 g/l chez l'adulte sain, par contre les protides totaux à la naissance ne dépassent pas 40 à 60 g/l.

La protidémie ne dépend pas seulement de la quantité absolue de protéines, mais aussi de la volémie. Celle-ci est appréciée dans la mesure de l'hématocrite permettant le dépistage d'une hémodilution ou d'une hémococoncentration (en l'absence d'anémie).

Dans le cas de protéines anormales ou de dysprotéinémie, 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),
 - défaut d'apport d'absorption,
 - 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.

3.2- L'interprétation du protéinogramme du sérum humain normal.

Les résultats de cet examen sont présentés sous deux formes :

- ❖ Un graphique (ou protéinogramme), résultat de l'intégration par lecture dans un densitomètre de la bande d'électrophorèse (voir figure 5).

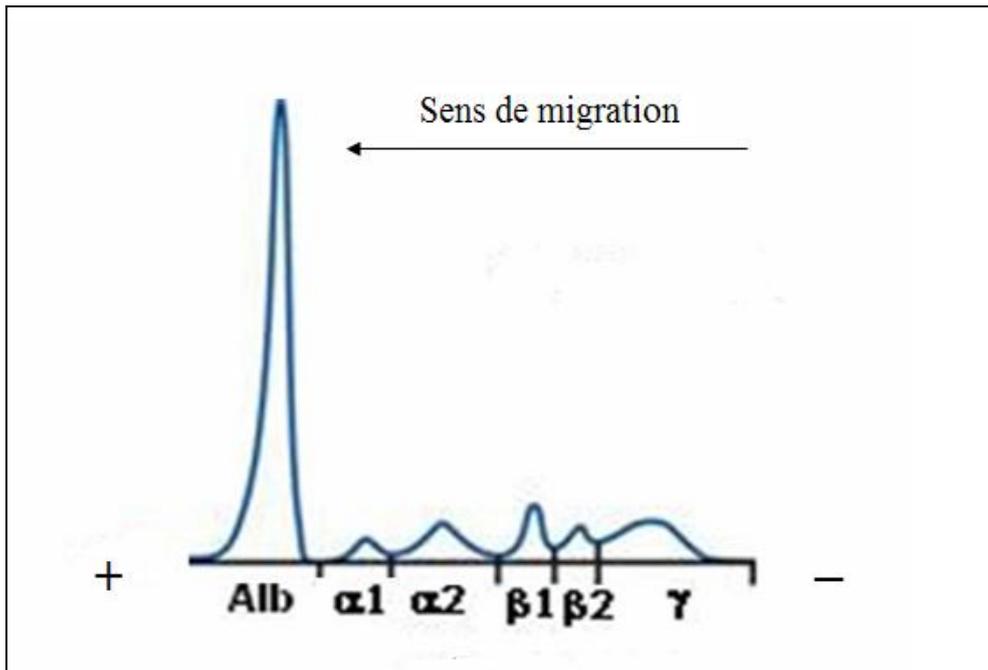


Figure 5 : protéinogramme sérique normale.

⇒ 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 2).

Fraction	g/l	%
Albumine	43-51	60-71
Alpha 1	1-2	1.4-2.7
Alpha 2	5-8	7-11
Bêta 1	4-6	6-9
Bêta 2	1-4	2-5
Gamma	6-12	8-16

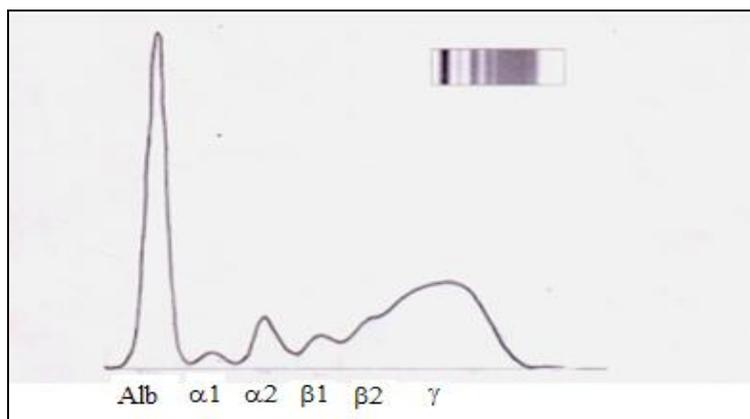
Tableau 2 : Fourchettes normales de différentes fractions des protéines sériques.

- 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.

3.3-Interprétation illustrée des principaux profils électrophorétiques anormaux (7)

⇒ Les différents profils rencontrés lors d'interprétation d'un protéinogramme sérique :

a) Bloc bêta gamma

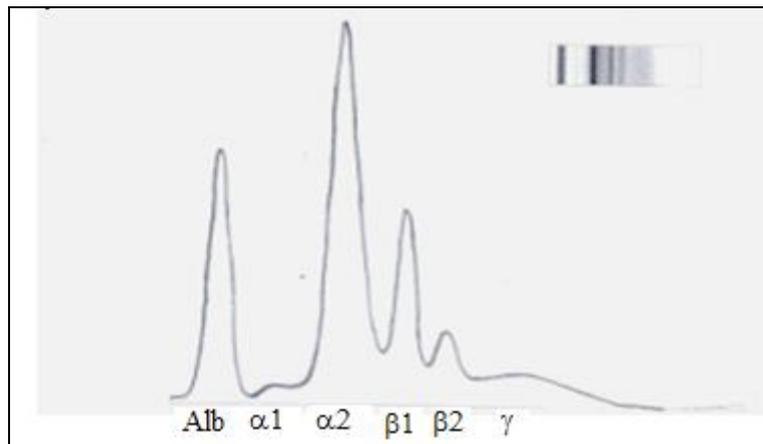


Bloc bêta gamma

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 les bêta et gamma globulines. Ce profil peut expliquer les pathologies suivantes : Hépatites chroniques virales, Hépatites médicamenteuses, cirrhose alcoolique ou cirrhose à un stade avancé.



b) Syndrome néphrotique

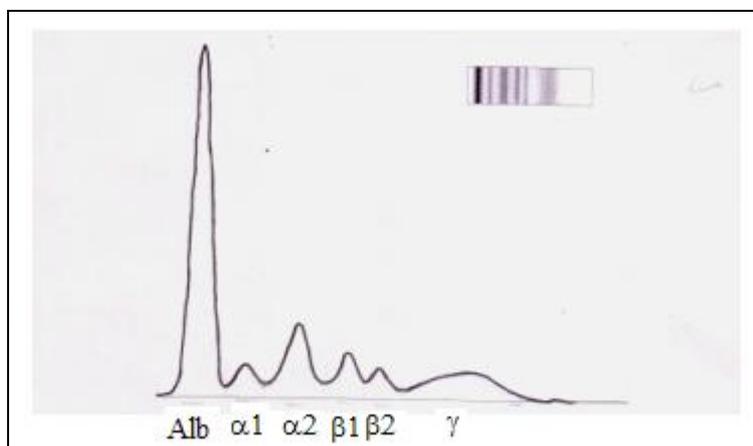


Syndrome néphrotique

Hyper alpha 2 important lié à l'augmentation de l' $\alpha 2$ -macroglobuline, associée à une hypoprotidémie sévère due à la fuite rénale et à une protéinurie massive. Ce profil est obtenu lors : d'une néphropathie diabétique, un néphrose lipoïdique ou une lésion rénale.

c) Syndrome inflammatoire

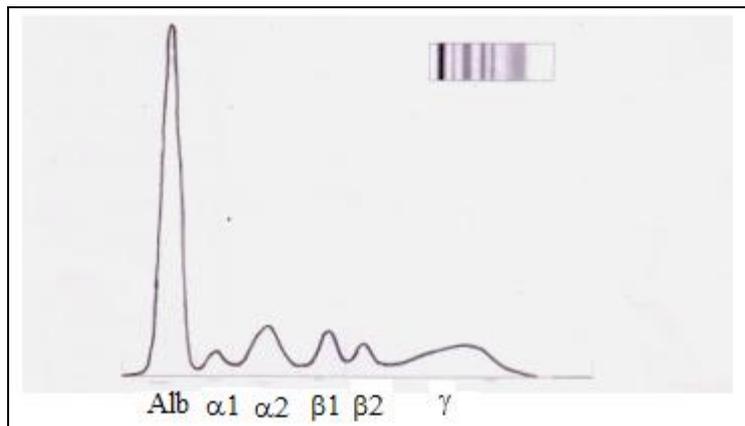
■ Syndrome inflammatoire aiguë.



Syndrome inflammatoire aiguë

Hyper alpha 1 et hyper alpha 2 globulines, liées à l'augmentation des protéines de la réaction inflammatoire aiguë, causée par : une inflammation, une maladie infectieuse, tumorale ou traumatique.

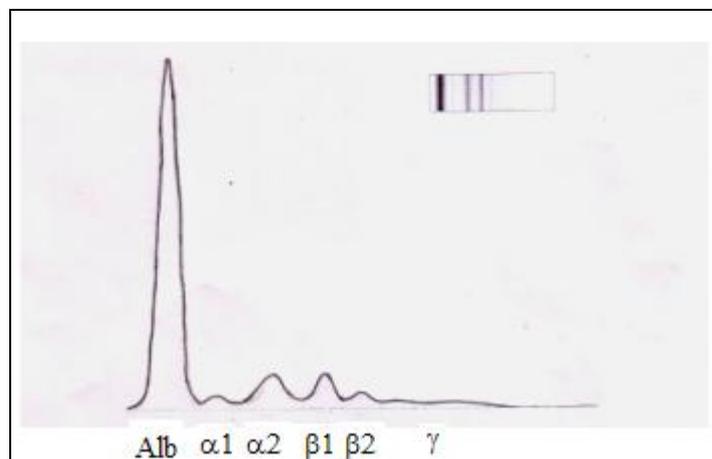
■ Syndrome inflammatoire chronique.



Syndrome inflammatoire chronique

Hyper alpha 1 et hyper alpha 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.

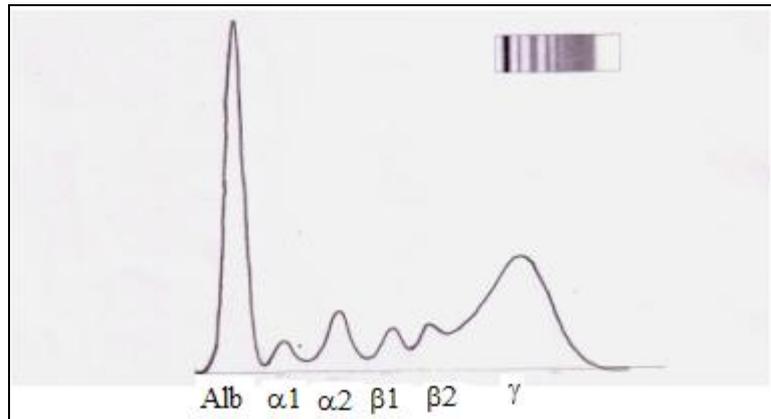
e) Hypogammaglobulinémie



Hypogammaglobulinémie

Hypogammaglobulinémie liée à une diminution congénitale ou acquise de la production des Ig, qui est causée par : un déficit immunitaire, un syndrome lymphoprolifératif, une immunosuppression acquise, une maladie de sang (leucémie lymphoïde chronique, myélome multiple...) ou une hypogammaglobulinémie physiologique chez l'enfant prématuré (cause physiologique).

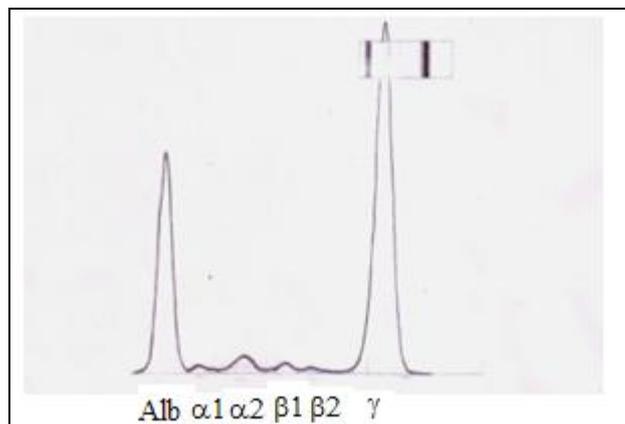
f) Hypergammaglobulinémie polyclonale



Hypergammaglobulinémie polyclonale

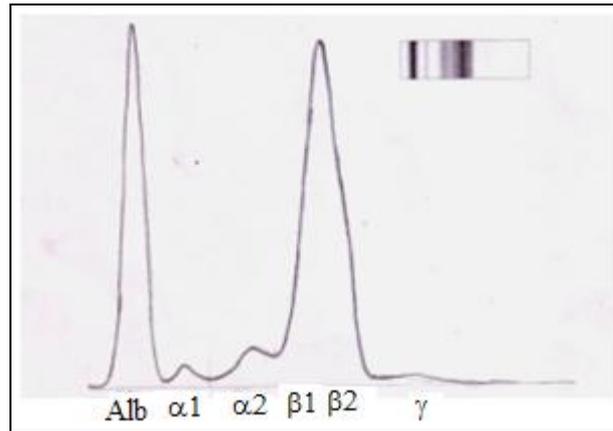
Hypergammaglobulinémie polyclonale liée à la stimulation de nombreux clones lymphocytaires B (d'où l'aspect "en dôme" du pic), qui est causée par: une maladie infectieuse, lymphatique, une hémopathie ou une augmentation des Ig dans les infections aiguës ou chroniques (cause physiologique).

g) Hypergammaglobulinémie monoclonale (les gammopathies monoclonales)



Pic monoclonal en zone gamma globulines (a)

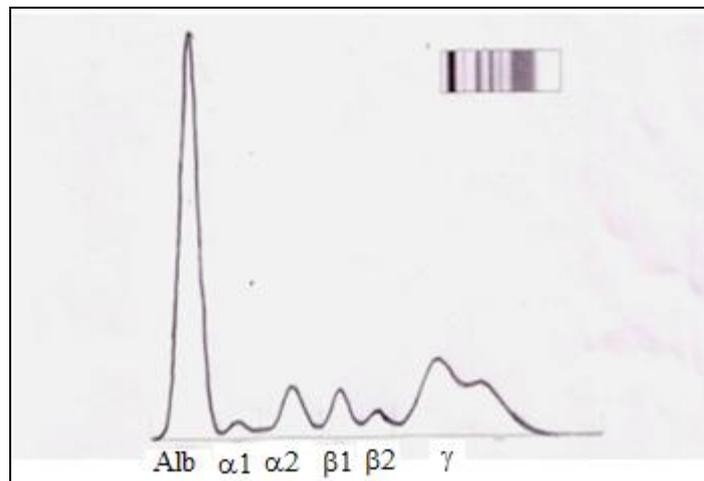
NB : une paraprotéine est une immunoglobuline produite par un seul clone cellulaire de lymphocyte B, population très représenté dans le plasma. Comme toutes les molécules sont identiques, la paraprotéine apparaît à l'électrophorèse du sérum sous la forme d'une bande étroite, classiquement dans la région gamma.



Pic monoclonal en zone bêta globulines (b)

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 le profil (a), soit dans la zone des bêta globulines pour le profil (b), associée aux gammopathies malignes ou bénignes (un myélome multiple, une macroglobulinémie de waldenstrôm), d'accompagnement (une leucémie lymphoïde chronique) ou les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS, Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance).

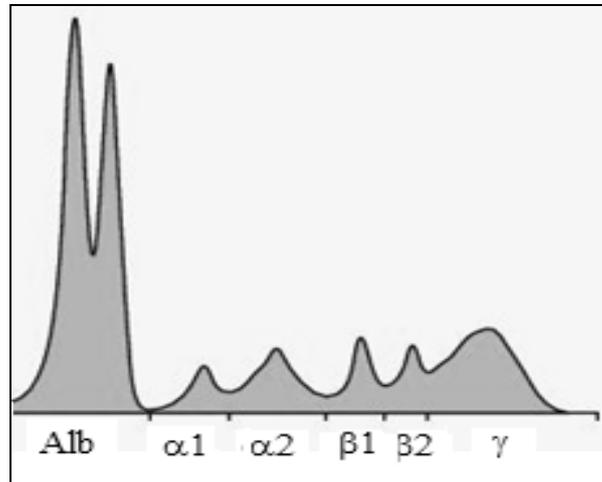
h) le profil oligoclonal



Profil oligoclonal

Présence d'un pic suspect au niveau des gammaglobulines à l'électrophorèse des protéines sériques. Cela est définit par la présence d'au moins deux clones des Ig.

i) Bisalbuminémie



Bisalbuminémie

Dédoublé 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 peut être obtenu lors d'une bisalbuminémie congénitale, médicamenteuse ou associée à une pancréatite.

III. IMMUNOFIXATION

1- Définition :

L'immunofixation est une technique immunologique permettant la détermination et la détection des chaînes lourdes (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) et des chaînes légères (κ , λ) libres et liées. Elle est réalisée en deux temps :

- Une séparation électrophorétique des constituants protéiques.
- Une réaction d'immunoprécipitation réalisée à l'aide d'immuns sérums spécifiques anti chaînes lourdes et légères.

Devant toute suspicion de gammopathies, il est conseillé de faire une immunofixation. Elle est recommandée dans les profils électrophorétiques suivants :

- Hypogammaglobulinémie.
- Un pic monoclonal en zone gamma ou bêta globulines.
- Le profil oligoclonal.

2- Généralités sur les gammopathies monoclonales :

Une gammopathie monoclonale est caractérisée par l'augmentation parfois très importante d'un seul type d'immunoglobuline appartenant à une classe et à une sous classe bien déterminée. Elle est due à la prolifération d'un seul clone de cellules B malignes ou hyperstimulées, productrices d'une population monoclonale d'immunoglobuline définie par son homogénéité.

Les raisons de l'apparition d'une immunoglobuline monoclonale sont encore mal connues et restent à l'état d'hypothèse : processus viral ou cancérigène, stimulation antigénique répétée, facteurs génétiques ou liés à l'environnement.

2.1- Etiologie des gammopathies monoclonales.

Les principales gammopathies monoclonales malignes sont :

- le myélome multiple (a immunoglobulines G et A),
- Macroglobulinémie de Waldenström, dite maladie de Waldenström (à immunoglobulines M),
- Lymphomes malins (leucémie lymphoïde chronique, lymphomes) non hodgkiniens,
- Maladies des chaînes lourdes

Une gammopathie monoclonale peut être retrouvées lors de certaines affections :

- Cancers
- Cirrhoses
- Inflammation chronique
- Maladies auto-immunes

2.2- Les immunoglobulines monoclonales. (8)

Elles sont dues à la prolifération d'un clone unique de lymphocyte B produisant un anticorps en quantités abondantes au point que cette immunoglobuline devient individualisable sous la forme d'un pic étroit qui déforme la zone gamma ou bêta à l'électrophorèse. La clonalité doit être confirmée par l'immunofixation.

Une immunoglobuline monoclonale est constitué soit d'une seule classe de chaîne lourde et d'un seul type de chaîne légère, soit de chaînes légères isolées d'un seul type, soit beaucoup plus rarement de fragments de chaînes lourdes d'une seule classe.

L'homogénéité d'immunoglobuline monoclonale est reflété par :

- L'identité de la charge électrique : leur mobilité électrophorétique est homogène, d'où l'existence d'un pic étroit dans les profils électrophorétiques.
- L'identité structurale : la population d'Ig monoclonales ne possède q'un seul type de chaîne lourde et un seul type de chaîne légère, cette identité structurale sera d'ailleurs à la base du typage immuno-chimique par les techniques d'immunofixation.
- L'identité immunologique : l'ensemble des Ig monoclonales ont les mêmes déterminants iso-, allo et idiotypiques ; elles possèdent donc la même activité anticorps.

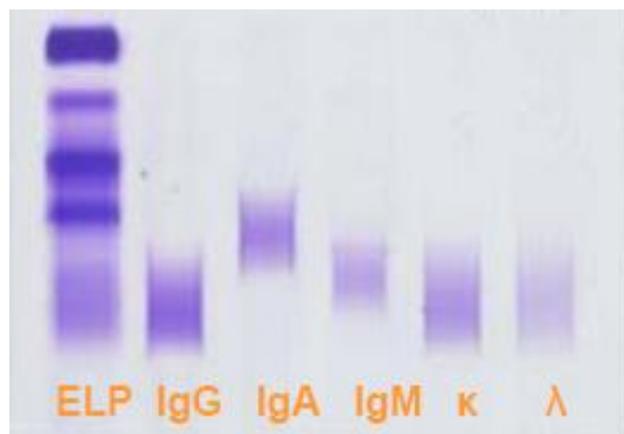
Cette immunoglobuline peut avoir des effets propres en raison de particularités physicochimiques :

- Augmentation de la viscosité sanguine ;
- Précipitation à froid : dénommée cryoglobulinémie, observée en particulier lors des hémopathies (leucémie lymphoïde chronique, maladie de Waldenström),
- Précipitation dans les tubules rénaux ;
- Dépôt dans les tissus responsable d'une amylose ;
- Action auto anticorps : anticorps anti-myéline (anti-MAG) responsable de neuropathie périphérique ou activité facteur rhumatoïde, hémolytique, etc.

3-Interprétation d'un profil d'immunofixation : (9)

■ Absence de bande monoclonale :

- Un sérum normal montre des zones diffuses peu colorées correspondant aux immunoglobulines polyclonales : IgG, IgA, IgM, κ , λ . Une hypergammaglobulinémie entraîne une zone diffuse plus colorée mais sans bande distincte.



Immunofixation d'un profil normal

■ Présence d'une bande monoclonale :

- Une gammopathie (présence d'une immunoglobuline monoclonale) est caractérisée par une bande étroite détectée avec l'un des anti-chaînes lourdes et avec l'un des anti-chaînes légères (kappa ou lambda). La fraction monoclonale mise en évidence, généralement étroite et bien visible, doit être située au même niveau de migration que la bande détectée sur la piste de référence (ELP).

- L'absence de réaction avec l'un des anti-chaînes lourdes appliqué, mais avec présence d'une chaîne légère peut signifier :

a) la présence d'une gammopathie à Ig D ou Ig E qu'il conviendra de confirmer avec les anti-chaînes lourdes delta ou epsilon,

b) la présence d'une chaîne légère libre est réalisée avec des antisérums spécifiques anti-chaînes légères libres kappa ou lambda, cette confirmation évoque la présence d'une maladie de chaînes légères.

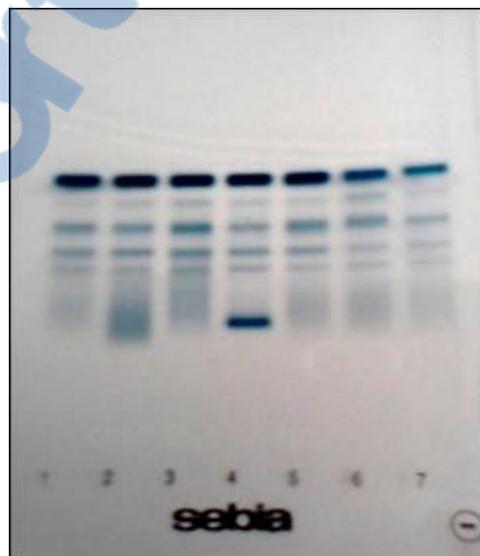
- L'absence de réaction avec les anti-chaînes légères mais avec présence d'une chaîne lourde, est rare. Il conviendra de confirmer la présence d'une maladie des chaînes lourdes gamma, alpha ou mu.

■ Présence de plusieurs bandes monoclonales :

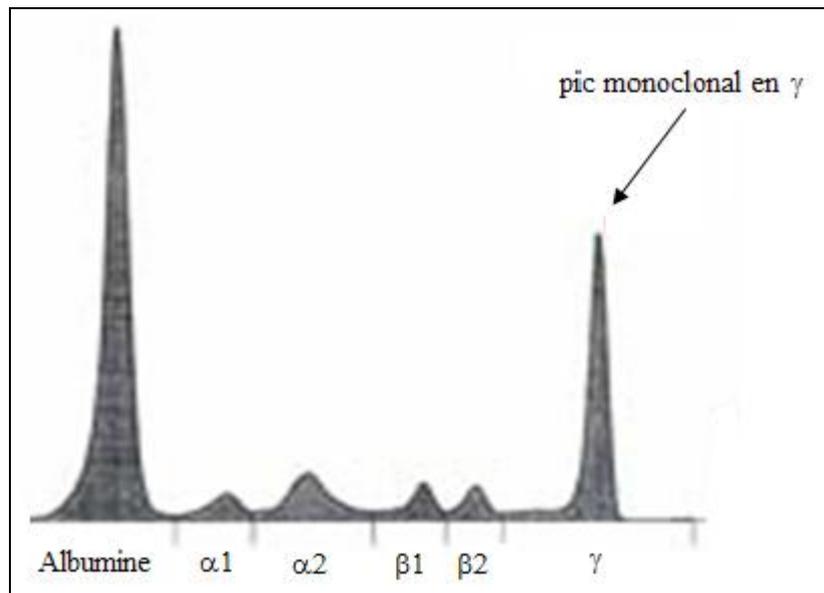
- La même interprétation s'applique en présence de plusieurs bandes monoclonales. Ces cas plus rares correspondent à la prolifération de plusieurs clones de cellules B. Une gammopathie biclonale sera détectée par la présence de deux chaînes lourdes (identiques ou différentes) et de deux chaînes légères (identiques ou différentes).
- Des immunoglobulines polymérisées sont caractérisées par la présence de plusieurs bandes sur une même chaîne lourde et une même chaîne légère. Il conviendra d'effectuer un traitement réducteur au β -mercaptoéthanol et de renouveler l'immunofixation pour confirmer la présence d'une seule anomalie monoclonale.
- Un profil oligoclonal est caractérisé par la présence de bandes multiples sur une ou plusieurs chaînes lourdes et sur l'une ou les deux chaînes légères.

✿ Exemples :

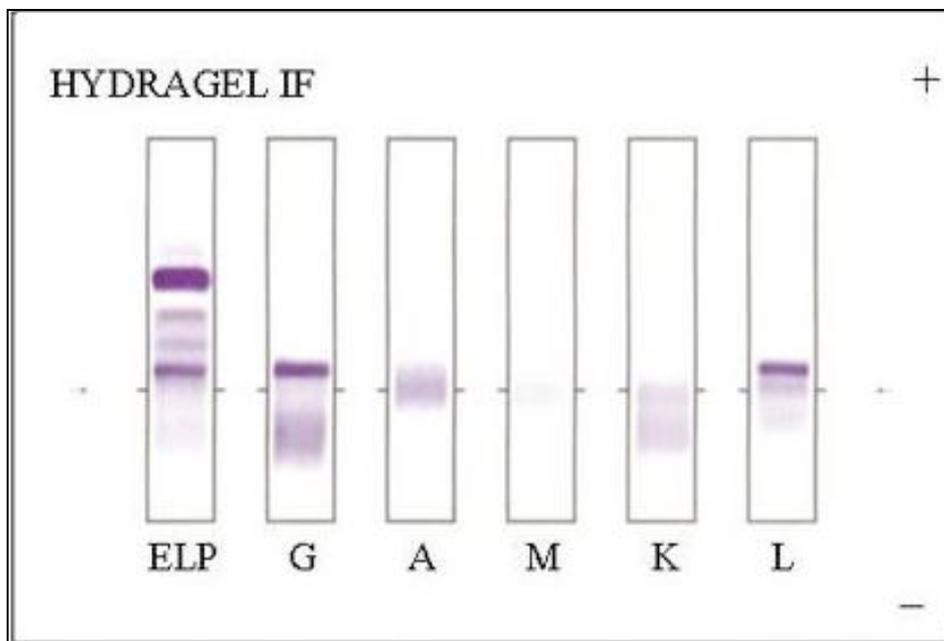
Le gel ci-dessous obtenu par l'électrophorèse des protéines sériques montre une bande monoclonale en zone gamma dans la position 4.



Le profil électrophorétique suivant obtenu par densitomètre montre un pic monoclonal au niveau de gammaglobulines.



IMMUNOFIXATION



Le gel ci-dessus obtenu par immunofixation montre une bande monoclonale IgG de type lambda.

PARTIE 2

MATERIEL ET METHODES

I. Le 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 et service ».
- Prélèvement sanguin : l'exploration se fait sur sérum uniquement (sur tube sec), car le fibrinogène présent dans le plasma sanguin simule un pic monoclonal en bêta globulines.
- Transport du tube (système pneumatique).
- Triage des tubes (identification de tube et son bon) sur la paillasse.

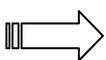
II. Le stade analytique. (10)

1- Le matériel utilisé :

a) Les automates utilisés :

- ✓ « OLYMPUS AU 640/400 » pour le dosage des protéines totales sériques.
- ✓ Un système HYDRASYS SEBIA, pour l'électrophorèse et l'immunofixation des protéines. Ce système compact effectue toutes les phases de l'électrophorèse, de l'application d'échantillon, la migration, l'incubation, la coloration, décoloration et séchage.
- ✓ « HYDRYS SEBIA », équipe du logiciel « PHORESIS SEBIA » (un scanner ou densitomètre capable de lire le gel d'électrophorèse).

b) Composition des kits utilisés :



l'électrophorèse des protéines sériques est réalisé avec des kits HYDRAGEL 7 β 1 β 2, commercialement disponibles, et *l'immunofixation* est effectué sur des kits HYDRAGEL IF. Ces kits sont composés de :

1- GELS D'AGAROSE :

Les gels d'agarose sont prêts à l'emploi. Chaque gel contient : agarose (8 g/l) ; tampon Tris barbital à pH= 8,5 \pm 0,1 pour l'EPP et à pH= 9.1 \pm 0,1 pour l'IF; composants sans danger aux concentrations utilisées, nécessaires pour des performances optimales.

Ils sont utilisés comme support pour l'électrophorèse des protéines et l'immunofixation. Chaque gel d'agarose est prévu pour l'analyse de 7 échantillons pour le kit HYDRAGEL 7 β 1 β 2, et pour un échantillon pour l'IF.

2- MÈCHES TAMPONNÉES :

Les mèches en éponge tamponnées sont prêtes à l'emploi. Chaque mèche tamponnée contient : tampon Tris barbital à pH= 8,5 \pm 0,3 pour l'EPP et à pH= 9.1 \pm 0,3 pour l'IF ;

1.38% de barbital et 0.225% d'azoture de Sodium (antiseptique), nécessaires pour des performances de la technique.

Elles jouent un rôle de réservoir de tampon pour l'électrophorèse et assurent le contact entre le gel et les électrodes.

3- COLORANT AMIDOSCHWARZ :

Le colorant amidoschwarz concentré est une solution visqueuse qui peut éventuellement gélifier, ce qui n'affecte absolument pas la qualité de la solution finale et son pouvoir de coloration. Il est utilisé pour la coloration des gels après séparation électrophorétique des protéines sériques.

Pour obtenir une parfaite reconstitution du colorant, il faut respecter le protocole suivant :

1. Ajouter environ 15 mL de diluant colorant (flacon de 60 ml) au flacon d'amidoschwarz concentré (flacon de 20 ml).
2. Refermer soigneusement le flacon.
3. Agiter très vigoureusement le flacon pendant au minimum 5 secondes.
4. Verser la solution obtenue dans le récipient de préparation de la solution de coloration.
5. Renouveler cette opération deux fois, trois fois, si nécessaire.
6. Compléter à 300 mL avec de l'eau distillée.
7. Agiter parfaitement cette solution pendant 5 à 10 minutes.

Le colorant est prêt à l'emploi, il contient une solution acide à $\text{pH} \approx 2$; amidoschwarz (4 g/l) et 6.7% de l'éthylène-glycol.

4- COLORANT VIOLET ACIDE :

Le flacon de violet acide concentré (flacon de 75 ml) doit être complété à 300 ml avec de l'eau distillée.

Après dilution, la solution colorante contient : solution acide à $\text{pH} \approx 2$; violet acide (2 g/l) et 3.25% d'éthylène-glycol.

Il est utilisé pour la coloration des gels après immunofixation des protéines.

5- APPLICATEURS :

Ce sont des applicateurs prédécoupés, pour l'EPP : 7 puits utilisés pour 7 échantillons, et pour l'IF : 6 puits utilisés pour un seul échantillon. Ils servent pour le dépôt des échantillons.

6- PAPIERS-FILTRES FINS :

Ce sont des feuilles de papier-filtre, à usage unique pour l'absorption de l'excès du tampon tris barbital à la surface du gel avant l'application des échantillons.

7- PAPIERS-FILTRES ÉPAIS :

Ce sont des feuilles de papier-filtre, à usage unique pour l'absorption des protéines non précipitées du gel après l'étape d'immunofixation.

8- PEIGNES PAPIER-FILTRE :

Ce sont des feuilles de papier-filtre prédécoupées, à usage unique pour l'absorption de l'excès de réactifs à la surface du gel après l'étape d'immunofixation.

c) Autres réactifs utilisés :

1- SOLUTION DECOLORANTE :

Chaque flacon de décolorant concentré (flacon de 100 ml) commercialement disponibles, doit être dilué au 1/1 000 avec de l'eau distillée : Prélever par quantité de 5 ml et compléter à 5 litres avec de l'eau distillée. Après dilution, la solution décolorante contient 0.5 g/l d'acide citrique.

Il est utilisé pour la décoloration, c'est-à-dire l'élimination de l'excès de colorant après coloration du gel, ainsi que pour le rinçage de la cuve de coloration après lavage.

2- SOLUTION DE LAVAGE :

Chaque flacon de solution de lavage HYDRASYS concentrée commercialement disponible (flacon de 80 ml), doit être complété à 5 litres avec de l'eau distillée. Après dilution, la solution de lavage contient : tampon alcalin, pH $8,8 \pm 0,3$ et l'azoture de sodium.

Il est utilisé pour le lavage du gel après immunofixation afin d'éliminer les protéines résiduelles non précipitées, ainsi pour le lavage périodique de la cuve de coloration de l'HYDRASYS (maintenance).

3- DILUANT :

Le diluant est prêt à l'emploi. Il contient : tampon alcalin à pH $7,5 \pm 0,3$ et le bleu de bromophénol.

Il est utilisé pour la dilution des échantillons. Le bleu de bromophénol permet de vérifier la bonne application des échantillons et la qualité de la migration.

4- COFFRET D'ANTISÉRUMS ET DE FIXATEUR :

Le fixateur est prêt à l'emploi. Il contient : une solution acide et des composants sans danger aux concentrations utilisées, nécessaires pour des performances optimales.

Il a une couleur spécifique pour éviter toute erreur lors de l'utilisation. La couleur est rappelée sur l'étiquette du flacon. Il est utilisé pour la fixation des protéines séparées par électrophorèse sur la piste référence (ELP), il est spécifique à la technique d'immunofixation réalisée avec les masques SEBIA.

Les antisérums sont prêts à l'emploi. Ils contiennent des immunoglobulines totales de mammifère anti-humaines. Chaque réactif a une couleur spécifique pour éviter toute erreur lors de l'utilisation. La couleur est rappelée sur les étiquettes des flacons. Ils sont utilisés pour l'immunoprécipitation des protéines séparées par électrophorèse.

5- ÉQUIPEMENT ET ACCESSOIRES NÉCESSAIRES :

1. Micropipettes de 10µl, 50 µl, 100 µl et 200 µl pour la dilution des échantillons et le chargement des applicateurs.
2. Bidons plastiques fournis avec le système HYDRASYS pour la solution de lavage et la solution décolorante.
3. Masque SEBIA de migration pour la fixation des antisérums.

2-Les techniques à réaliser :

2.1- Dosage des protéines sériques.

☀ Intérêt du dosage :

C'est un test de coloration photométrique utilisé dans la détermination quantitative des protéines totales dans le sérum humain. Le réactif est commercialement disponible, prêt à l'emploi et peut être placé directement sur les analyseurs OLYMPUS (AU 640/400).

Un écart entre le dosage des protéines totales sériques et l'intervalle de référence (60 à 80 g/l) indique une dysprotéinémie ou un trouble de l'équilibre hydro électrolytique. Ces deux pathologies peuvent être différenciées par des tests supplémentaires tel que : l'électrophorèse des protéines sériques et le dosage pondéral des immunoglobulines.

Donc, pour interpréter la signification de la concentration en protéines totales, il est utile de connaître plus spécifiquement les différentes fractions individuelles, par exemple : l'albumine et les globulines.

☀ Principe du test :

Le dosage est réalisé selon la méthode de Biuret. Les ions cuivriques en solution alcaline réagissent avec les protéines et les polypeptides pour former un complexe de couleur violet. L'absorbance du complexe à 540/660 nm est directement proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon.



✚ Contenu et composition des réactifs utilisés au cours de ce test :

- Hydroxyle de sodium : 200 mmol/l.
- Tartrate double de sodium et de potassium : 32 mmol/l.
- Sulfate de cuivre : 18.8 mmol/l.
- Iodure de potassium : 30 mmol/l.

2.2- L'électrophorèse des protéines sériques :

✿ UTILISATION :

L'HYDRAGEL 7 β 1- β 2 est le gel d'agarose qui permet la séparation en tampon alcalin (pH= 8,5) des protéines du sérum humain par électrophorèse dans le système semi-automatique HYDRASYS. Les protéines du sérum normal humain sont séparées en six fractions majeures.

Le système HYDRASYS permet de réaliser toutes les séquences jusqu'à l'obtention du gel prêt pour l'analyse qualitative ou quantitative. Les protéines séparées sont colorées par une solution d'amidoschwarz et l'excès du colorant est éliminé en milieu acide.

Les profils électrophorétiques sont analysés visuellement pour détecter les anomalies. La densitomètre donne une quantification relative précise de chaque zone individualisée.

Chaque gel d'agarose du kit HYDRAGEL β 1 β 2 est prévu pour l'analyse de 7 échantillons ou patients.

✿ PRINCIPE DU TEST :

L'électrophorèse des protéines du sérum humain est une analyse très utile en laboratoire d'analyses cliniques pour rechercher les modifications du profil protéique. Des techniques d'électrophorèse de zone ont été développées, sur différents supports, chacun donnant un fractionnement des protéines sériques en fonction de leur charge, dans un tampon de pH donné. L'agarose, d'utilisation très facile, a été choisi comme support, il donne une meilleure séparation des constituants sériques humains en six fractions de mobilité différente, en utilisant le kit HYDRAGEL β 1 β 2 : albumine, alpha-1 globulines, alpha-2 globulines, bêta-1 globulines, bêta-2 globulines et gamma globulines.

❖ RÉACTIFS FOURNIS DANS LES KITS HYDRAGEL 7 β 1- β 2 :

composants	Nombre
Gel d'agarose (prêts à l'emploi)	10 gels
Mèches tamponnées (prêtes à l'emploi)	10 sachets de 2
Diluant colorant (solution concentrée)	Un flacon de 60 ml
COLORANT amidoschwarz (solution concentrée)	Un flacon de 20 ml
Applicateurs (prêts à l'emploi)	Une boîte de 10 (7 dents)
Papiers filtres fins	Un sachet de 10

✿ Mode opératoire :

Le système HYDRASYS est un instrument multiparamétrique semi-automatique qui assure le traitement des HYDRAGEL selon les étapes suivantes :

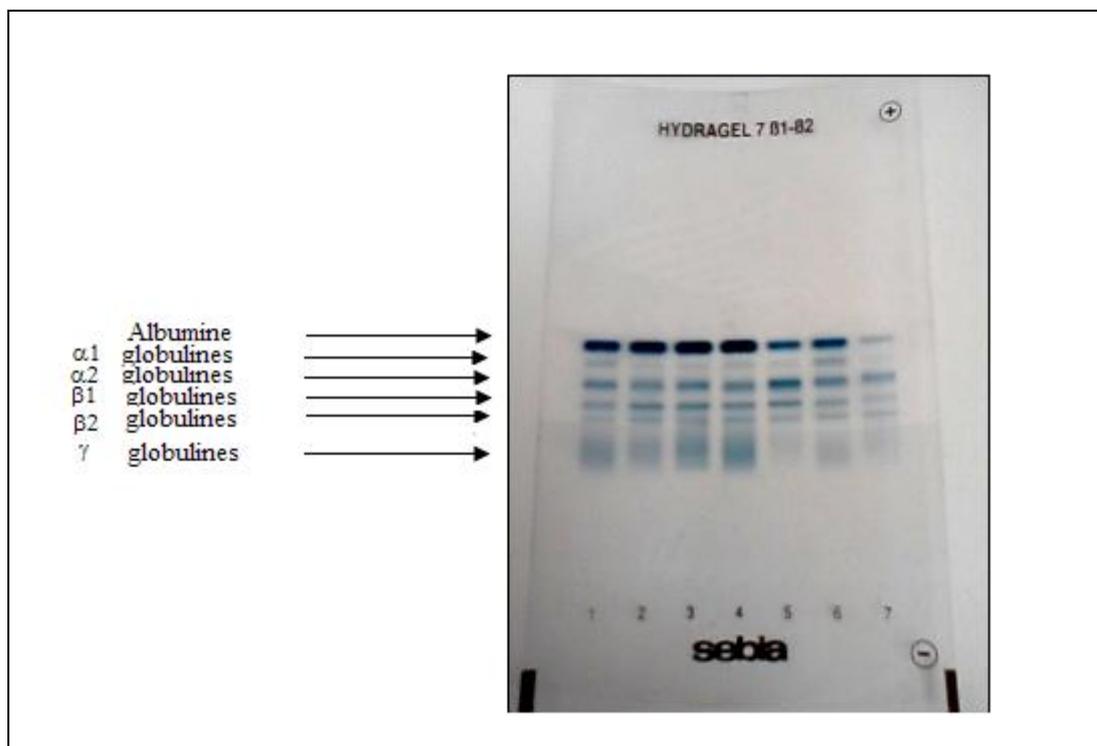
■ Application des échantillons :

- Poser un applicateur pour HYDRAGEL 7 β 1- β 2 (7 échantillons), à plat sur la paillasse.
- Déposer 10 μ l de sérum pur des différents échantillons dans chaque puits ; le chargement de chaque applicateur ne doit pas excéder 2 minutes.

■ Migration électrophorétique :

- Ouvrir le capot du module de migration et relever les chariots porte- applicateurs et porte électrodes.
 - Sélectionner le programme de migration "7 B1-B2" dans le menu de l'automate.
 - Sortir les mèches tamponnées de leur emballage en les manipulant par les languettes plastiques et fixer les mèches sur le chariot porte électrodes.
 - Sortir le gel de son emballage et éliminer rapidement l'excès du tampon en surface, en effleurant le gel avec un papier-filtre fin.
 - Déposer le gel sur le plateau de migration après avoir déposé 120 µl d'eau distillée.
 - Eliminer la protection plastique des dents d'applicateur et le placer sur la porte applicateur en position 6.
 - Fermer le capot du module de migration et démarrer immédiatement la séquence en appuyant sur "START".
- Séchage du film à 65 °C, pendant 10 minutes par montée de la température du plateau.
- Coloration : après la migration, ouvrir le capot, retirer l'applicateur et les mèches et les jeter, ensuite récupérer le film et l'introduire dans le module de coloration du gel avec la programmation du colorant amidoschwaz (sélectionner le programme de coloration "PROTEIN(E)/β1-β2" dans le menu et démarrer la séquence en appuyant sur "START")
- Décoloration.
- Séchage final.
- Fin du traitement du gel : sortir le porte film du compartiment, ouvrir le porte film et retirer le gel sec, et passer à la lecture au densitomètre / scanner à 570 nm.

A titre indicatif, un gel de 7 puit obtenu après l'EPP :



2.3- L'immunofixation.

✿ UTILISATION :

Les kits HYDRAGEL 1 IF permettent la détection des protéines monoclonales dans le sérum humain par immunofixation sur gel d'agarose dans le système semi-automatique HYDRASYS.

Le système HYDRASYS permet de réaliser toutes les séquences jusqu'à l'obtention du gel prêt pour l'interprétation. Les protéines sont séparées en tampon alcalin (pH 9,1) puis immunoprécipitées par les antisérums des différentes spécificités : anti-chaînes lourdes IgG, IgA et IgM, et anti-chaînes légères kappa et lambda (libres et liées).

Après immunofixation, les protéines précipitées sont colorées par une solution de violet acide. L'excès de colorant est éliminé en milieu acide.

Chaque gel d'agarose est prévu pour l'analyse d'un seul échantillon.

✿ PRINCIPE DU TEST :

Les immunoglobulines monoclonales, marqueurs des gammopathies, sont détectées lors de l'électrophorèse des protéines. Elles se présentent sous forme de bandes anormales situées essentiellement dans les zones bêta ou gamma globulines.

L'immunofixation effectuée à l'aide d'antisérums monospécifiques permet l'identification des bandes monoclonales dépistées par électrophorèse.

✿ Mode opératoire :

Elle se réalise en quatre étapes :

- Séparation électrophorétique des protéines sur gel d'agarose :
 - Afin d'éviter des phénomènes de zone par excès d'antigène, les échantillons de sérum doivent être déposés dilués :

piste	Sérum (µl)	Diluant (µl)	piste
Piste immunologique G	20	100	2
Profil électrophorétique ELP et autres pistes immunologiques.	30	60	1, 3, 4,5 et 6

- Déposer 10 µl du sérum dilué dans chaque puits de l'applicateur, et lancer la migration électrophorétique après avoir choisi le programme de migration « IF MS/MD ».
- Fixation et immunoprécipitation des protéines séparées par électrophorèse : application du fixateur et les antisérums sur le gel, au niveau des pistes de migration :
 - Mettre en place le masque IF de dépôt des réactifs sur le gel.
 - Déposer les réactifs en procédant comme suit :

piste	couleur	Volume (μ l)
ELP (fixateur)	jaune	40
G (antisérum antichaîne lourde γ)	rose	25
A (antisérum antichaîne lourde α)	Bleu foncé	25
M (antisérum antichaîne lourde μ)	Jaune vert	25
K (antisérum antichaîne légère κ)	Vert clair	25
L (antisérum antichaîne légère λ)	Bleu clair	25

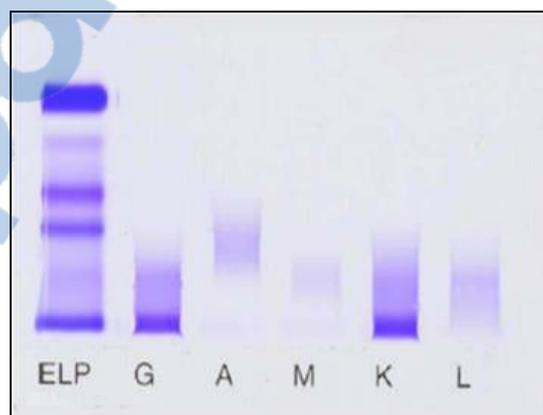
Le fixateur et les antisérums diffusent sur le gel. Le fixateur précipite toutes les protéines et les anticorps précipitent les antigènes correspondants.

- Élimination des protéines non précipitées par pompage avec la peigne et le papier filtre épais. Les protéines précipitées restent piégées sur le gel.
- Séchage.
- Coloration des protéines : introduire le gel dans le module de coloration du gel après avoir sélectionné le programme de coloration « IF ACIDE VIOLET » dans le menu et démarrer la séquence en appuyant sur "START")

Pour identifier de façon précise la nature de la bande monoclonale, l'échantillon est testé sur six pistes. Une piste (ELP) sert de référence grâce à la précipitation de toutes les protéines présentes ; les cinq autres pistes permettent de caractériser la ou les bandes monoclonales grâce à des anticorps spécifiques anti-chaînes lourdes IgG, IgA et IgM, et anti-chaînes légères kappa et lambda (libres et liées).

Cette technique simple et rapide donne une image claire d'une façon qualitative et très facilement interprétable à l'œil nu.

A titre indicatif, le gel du patient obtenu après immunofixation :



2.4- Outils statistiques.

❖ Traitement des données :

Nous avons utilisé une base de données informatisée « SPSS » (Statistical Package For The Social Science) ; qui est un logiciel de gestion et d'analyse de données statistiques complété par un programme « EXCEL » qui a permis de représenter les résultats sous forme de graphiques.

PARTIE 3

Résultats et Discussion

Résultats

Les résultats présentés dans ce mémoire sont le fruit d'une étude rétrospective réalisée pendant l'année 2010. Cette étude a été réalisée en consultant des bases de données du laboratoire de biochimie de l'hôpital CHU Hassan II de Fés.

❖ Aperçu sur la population étudiée :

Il s'agit d'une population hétérogène hospitalisée ou non dans les différents services de l'hôpital. Durant cette période l'effectif des patients ayant réalisés une électrophorèse des protéines sériques s'élève à 1743 personnes.

1-Répartition des électrophorèses selon le sexe des patients :

sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Sexe féminin	944	54
Sexe masculin	799	46

Tableau 1 : Répartition des électrophorèses selon le sexe des patients.

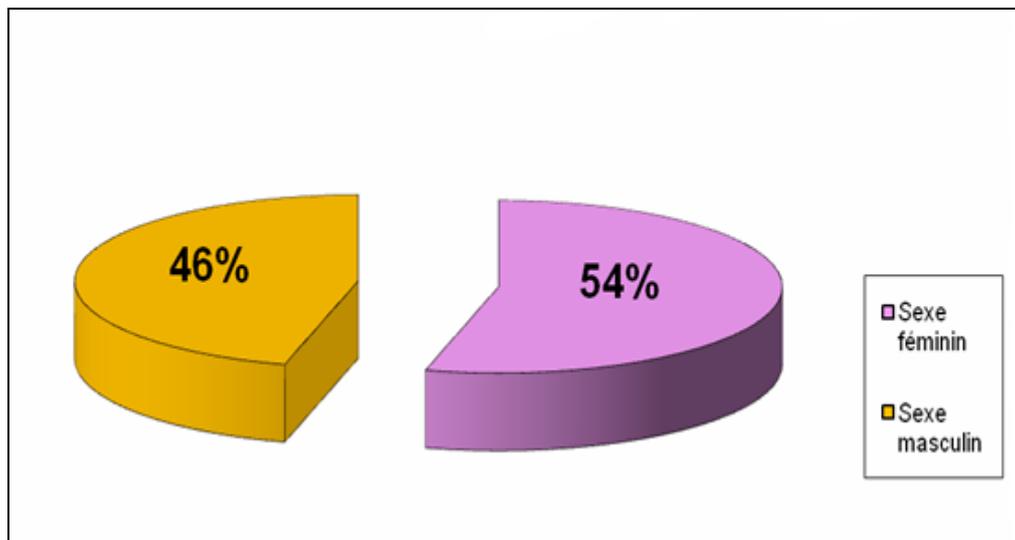


Figure 1 : Répartition des électrophorèses selon le sexe des patients

- Parmi la population étudiée, les patients de sexe féminin sont supérieurs aux patients de sexe masculin (944 versus 799, +8%) (figure 1).



2-Répartition des électrophorèses selon l'âge des patients :

Age	Effectif	Pourcentage (%)
0-15	146	8
15-30	319	18
30-45	338	19
45-60	531	31
60-75	316	18
75-90	84	5
90-100	9	1

Tableau 2 : Répartition des électrophorèses selon l'âge des patients.

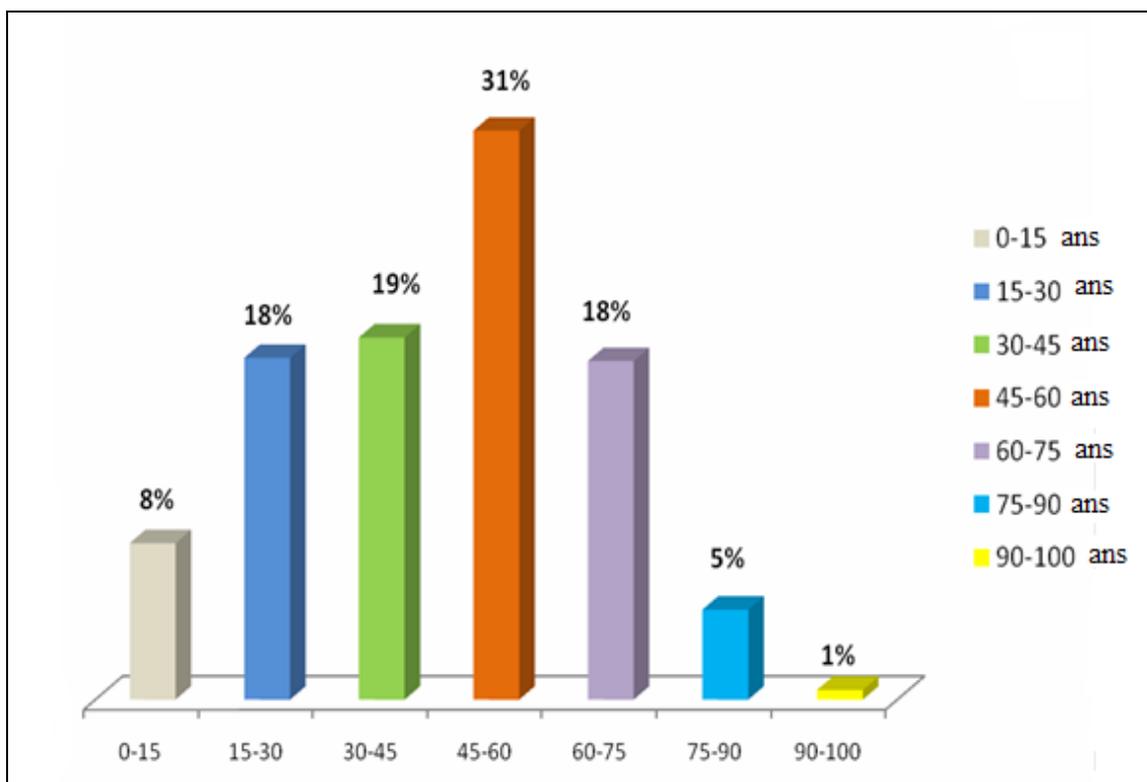


Figure 2 : répartition des électrophorèses selon l'âge des patients.

- D'après la figure 2, la plupart des patients demandeurs d'électrophorèse des protéines sériques, sont des personnes âgées entre 45 et 60 ans (31%).

3-Répartition des électrophorèses selon les services :

service	Effectif	Pourcentage (%)
Gastrologie	401	23
Médecine interne	303	17,4
Rhumatologie	237	13,6
Externe	226	13
Néphrologie	161	9,2
Dermatologie	138	7,9
Pédiatrie	128	7,3
Neurologie	61	3,5
Pneumologie	33	1,9
Cardiologie	29	1,7
Autres	26	1,5

Tableau 3 : Répartition des électrophorèses selon les services.

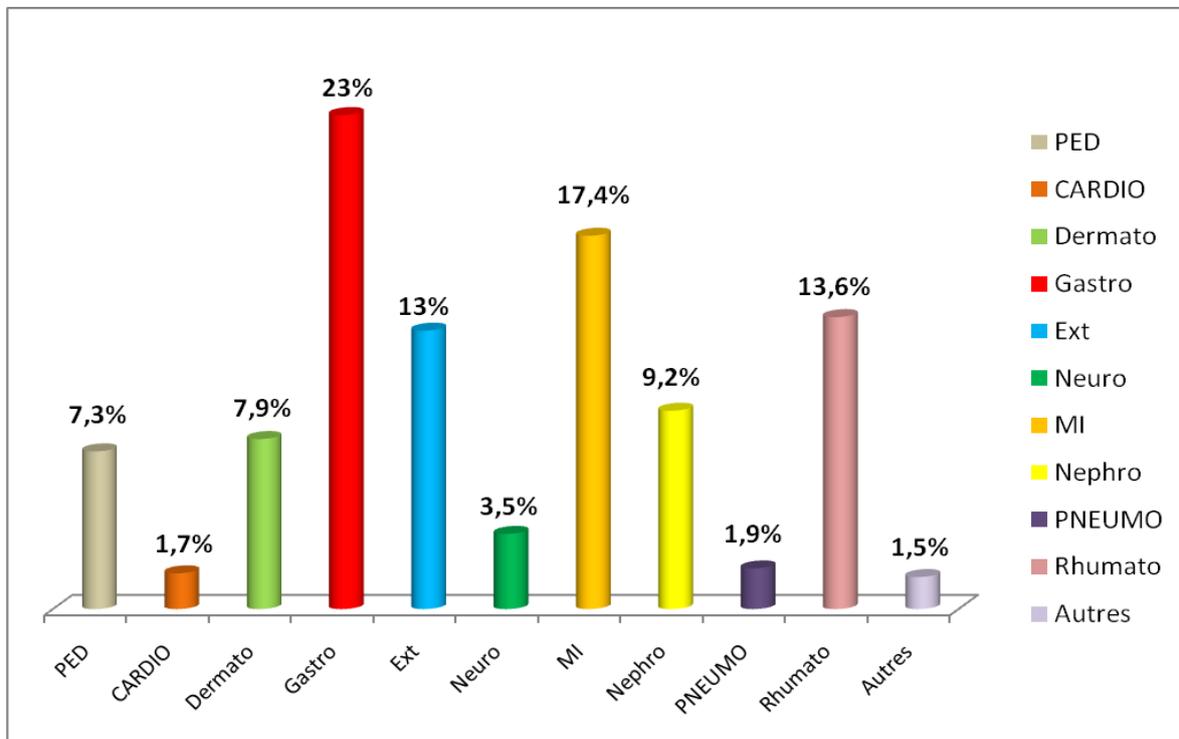
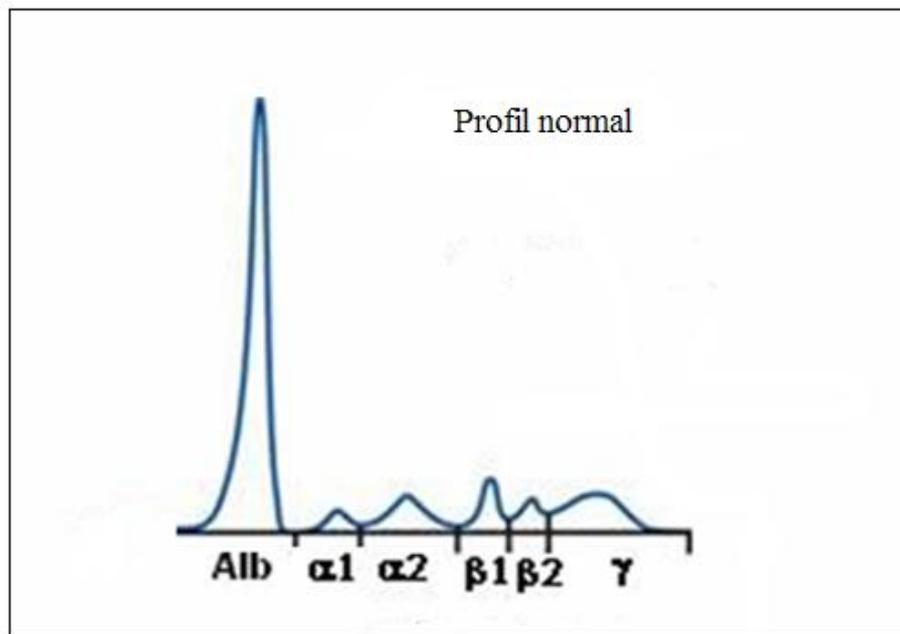


Figure 3 : Répartition des électrophorèses selon les services.

- D'après la figure 3, la plus importante demande d'électrophorèse des protéines sériques provient du service : gastrologie (23%), médecine interne (17.4%), suivie du rhumatologie (13.6%), externe (13%) et néphrologie (9.2%).

4-Répartition des électrophorèses selon le profil électrophorétique:

Un profil normal est un profil qui ne présente aucune anomalie au niveau de six fractions différentes des protéines sériques. Il est présenté dans la figure ci-dessous.



Par contre, tout résultat différent de ce profil est dit « profil anormal »

D'après notre étude, les résultats obtenus sont les suivants :

Les profils	Effectif	Pourcentage (%)
Profil anormal	1380	79
Profil normal	363	21

Tableau 4 : Répartition des électrophorèses selon le profil électrophorétique.

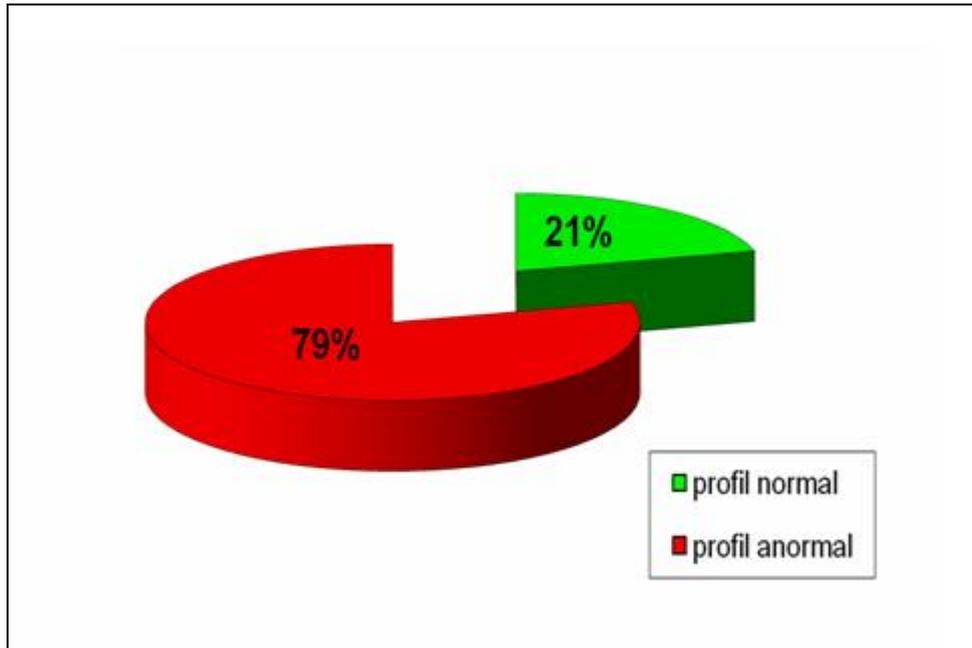


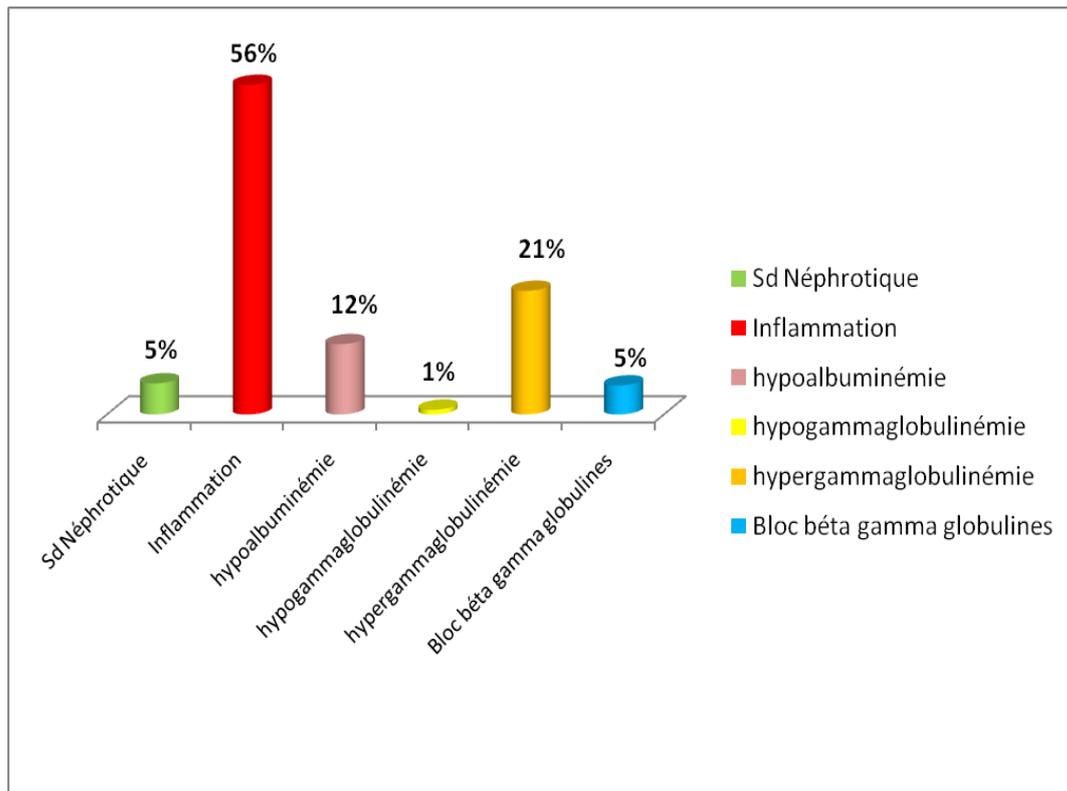
Figure 4 : Répartition des électrophorèses selon le profil électrophorétique.

- D'après notre étude, la majorité des patients demandeurs d'électrophorèse des protéines sériques a présenté un profil anormal (79%) (figure 4).

4.1-Répartition des électrophorèses selon les profils anormaux :

Les profils anormaux	Effectif	Pourcentage (%)
Inflammation	773	56
Hypergammaglobulinémie	290	21
Hypoalbuminémie	165	12
Syndrome néphrotique	73	5
Bloc bêta gamma	68	5
Hypogammaglobulinémie	11	1

Tableau 5 : Répartition des électrophorèses selon les profils anormaux.



. Figure 5 : Répartition des électrophorèses selon les profils anormaux.

- Cette figure, montre que la plupart des profils anormaux est due à des inflammations (56%), suivis des hypergammaglobulinémies (21%) et à des hypoalbuminémies (12%) (figure 5).

4.2-Répartition des électrophorèses selon le type d'inflammation :

Inflammation	Effectif	Pourcentage (%)
Inflammation chronique	425	55
Inflammation aiguë	348	45

Tableau 6 : Répartition des électrophorèses selon le type d'inflammation.

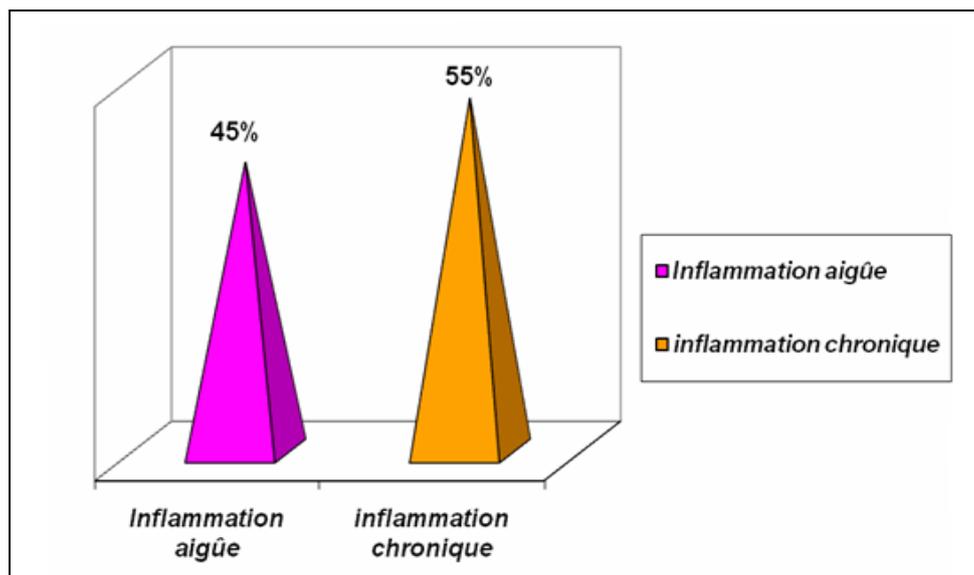


Figure 6 : Répartition des électrophorèses selon le type d'inflammation.

- La figure 6, montre qu'il y a une augmentation des inflammations chroniques (55%), par rapport à des inflammations aiguës (45%).

4.3-Répartition des électrophorèses selon les gammopathies :

4.3.1- Répartition des électrophorèses selon les différentes gammaglobulinémies :

Gammaglobulinémies	Effectif	Pourcentage (%)
Hypergammaglobulinémie polyclonale	239	79
pic monoclonal en gamma	35	12
Hypogammaglobulinémie	11	4
pic biclonal en gamma	9	3
pic monoclonal en bêta	5	2
pic monoclonal en gamma et bêta	2	1

Tableau 7 : Répartition des électrophorèses selon les différentes gammaglobulinémies.

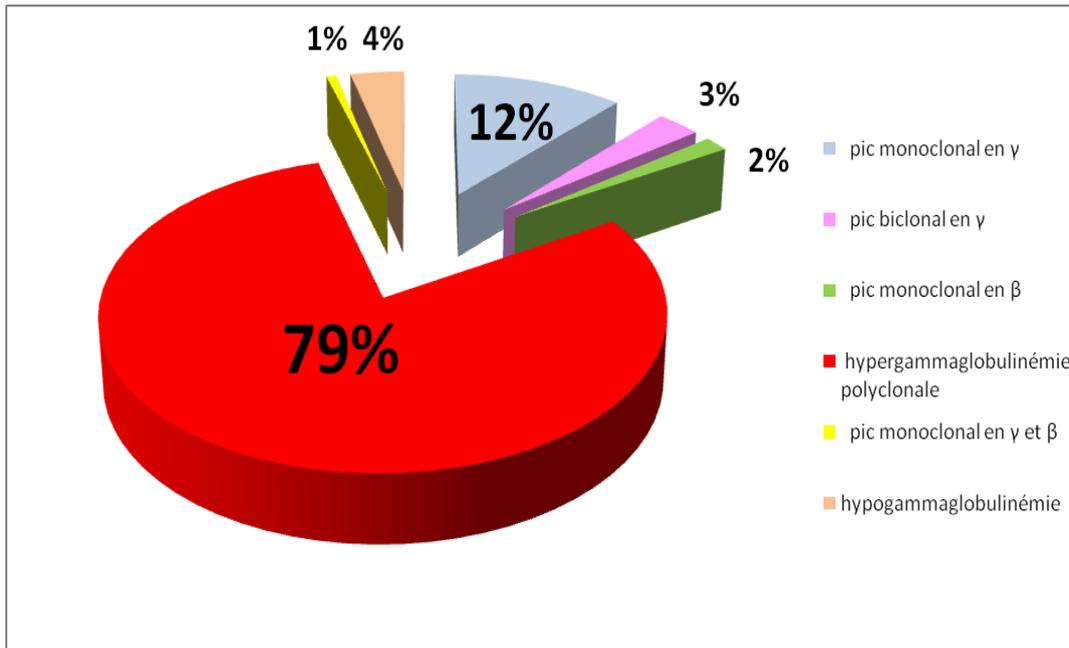


Figure 7 : Répartition des électrophorèses selon les différentes gammaglobulinémies.

- Cette figure montre que la majorité des gammopathies sont dues à des hypergammaglobulinémies polyclonales (79%), suivies des pics monoclonales au niveau des gammaglobulines (12%) et à des hypogammaglobulinémies (4%) (figure7).

4.3.2-Répartition des électrophorèses selon le sexe des patients atteints de gammopathie :

sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Sexe masculin	34	55
Sexe féminin	28	45

Tableau 8 : Répartition des électrophorèses selon le sexe des patients atteints de gammopathie.

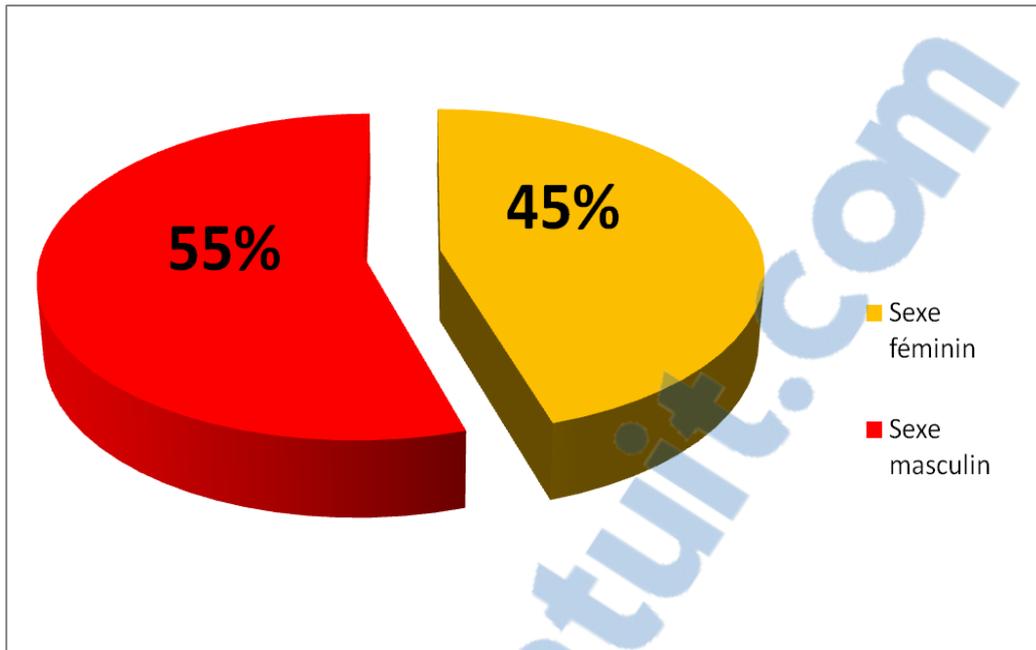


Figure 8 : Répartition des électrophorèses selon le sexe des patients atteints de gammopathie.

➤ La figure ci-dessus, montre que la plupart des patients atteints de gammopathie sont de sexe masculin (55%) par rapport aux patients de sexe féminin (45%).

4.3.3-Répartition des électrophorèses selon l'âge des patients atteints de gammopathie :

Age	Effectif	Pourcentage (%)
0-20	7	11
20-40	2	3
40-60	24	39
60-80	28	45
80-100	1	2

Tableau 9 : Répartition des électrophorèses selon l'âge des patients atteints de gammopathie.

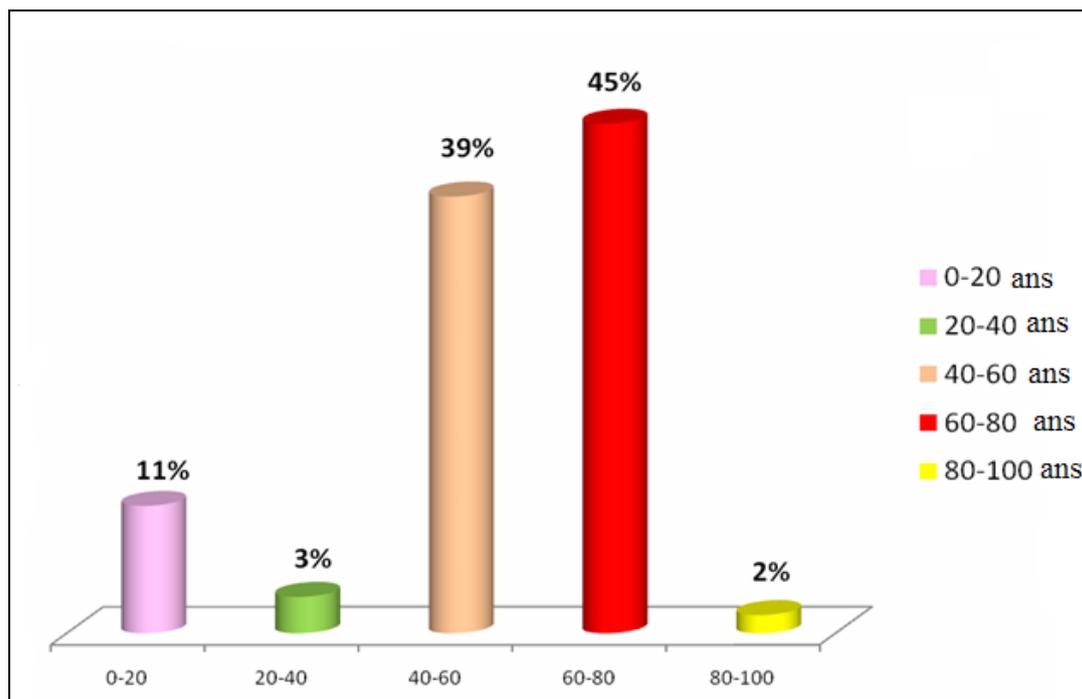


Figure 9 : Répartition des électrophorèses selon l'âge des patients atteints de gammopathie.

- Cette figure montre que les personnes âgées entre 40 et 80 ans, sont les plus touchées par les gammopathies (84% des cas) (figure 9).

4.3.4-Répartition des électrophorèses selon les services des patients atteints de gammopathie :

Service	Effectif	Pourcentage (%)
Médecine interne	17	27,4
Néphrologie	11	17,7
Externe	9	14,5
Gastrologie	7	11,3
Pédiatrie	6	9,7
Rhumatologie	5	8,2
Dermatologie	3	4,8
Neurologie	2	3,2
Cardiologie	1	1,6
Pneumologie	1	1,6

Tableau 10 : Répartition des électrophorèses selon les services des patients atteints de gammopathie.

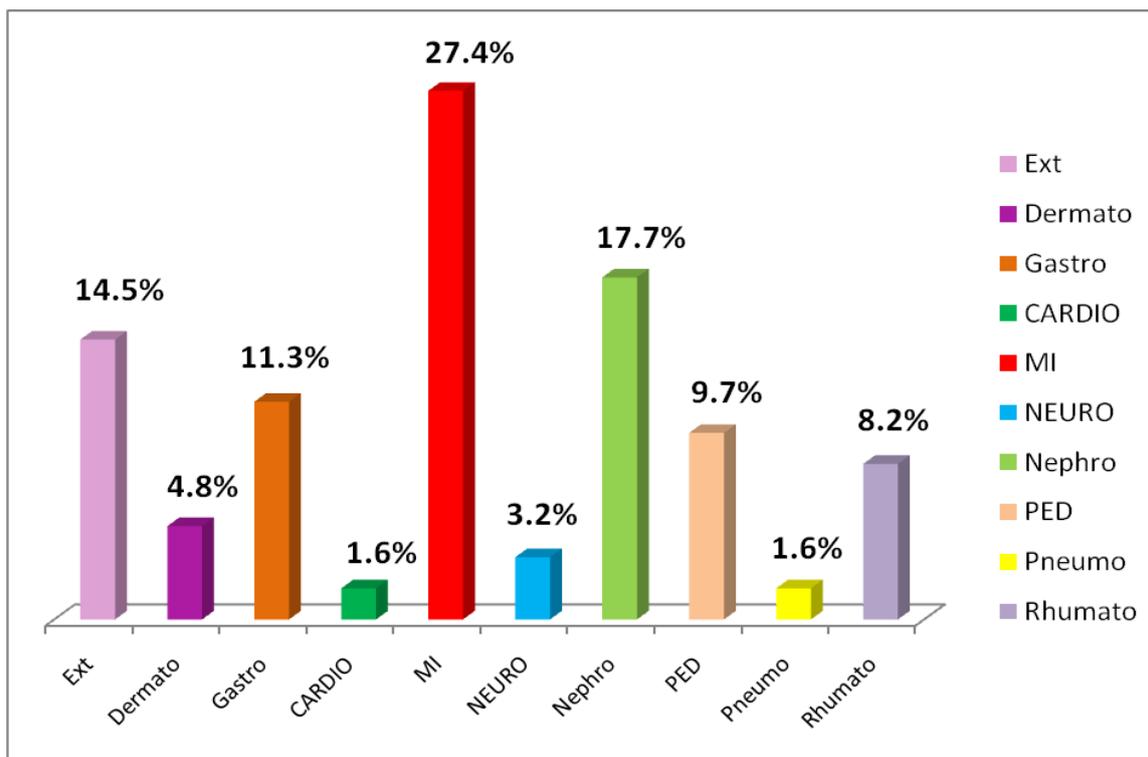


Figure 10 : Répartition des électrophorèses selon les services des patients atteints de gammopathie.

- D'après cette figure, la plupart des patients atteints de gammopathie proviennent essentiellement du service de médecine interne (27.4%), suivie des services de néphrologie (17.7%), externe (14.5%), gastrologie (11.3%) et pédiatrie (9.7%) (Figure 10).

4.3.5-Répartition des électrophorèses selon la protidémie des patients atteints de gammopathie :

Protidémie (g/l)	Effectif	Pourcentage (%)
30-60	11	18
60-80	27	44
80-130	24	39

Tableau 11 : Répartition des électrophorèses selon la protidémie des patients atteints de gammopathie.

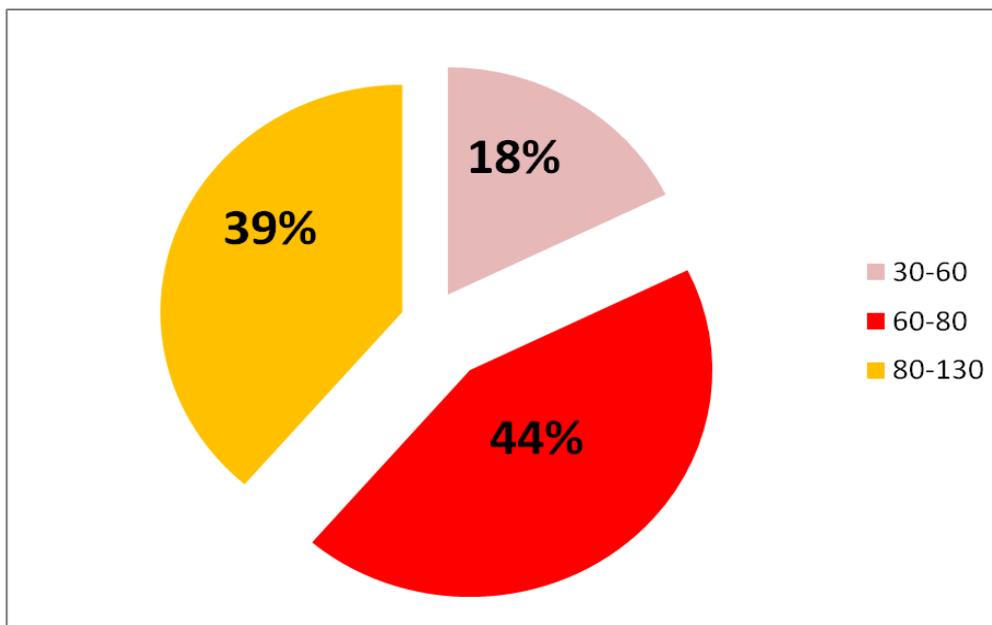


Figure 11 : Répartition des électrophorèses selon la protidémie des patients atteints de gammopathie.

- Parmi la population atteinte de gammopathie, 44% ont une protidémie située entre 60 et 80 g/l, suivie de 39% ont une protidémie supérieure à 80 g/l (figure 11).

4.3.6-Répartition des électrophorèses selon la classe et le type des immunoglobulines :

Les Immunoglobulines		Effectif	Pourcentage (%)
IgA	Kappa	5	8
	Lambda	5	8
IgG	Kappa	26	42
	Lambda	11	18
IgM	Kappa	5	8
	Lambda	1	2
IgD Lambda		1	2
Kappa		6	9
Lambda		2	3

Tableau 12 : Répartition des électrophorèses selon la classe et le type des immunoglobulines.

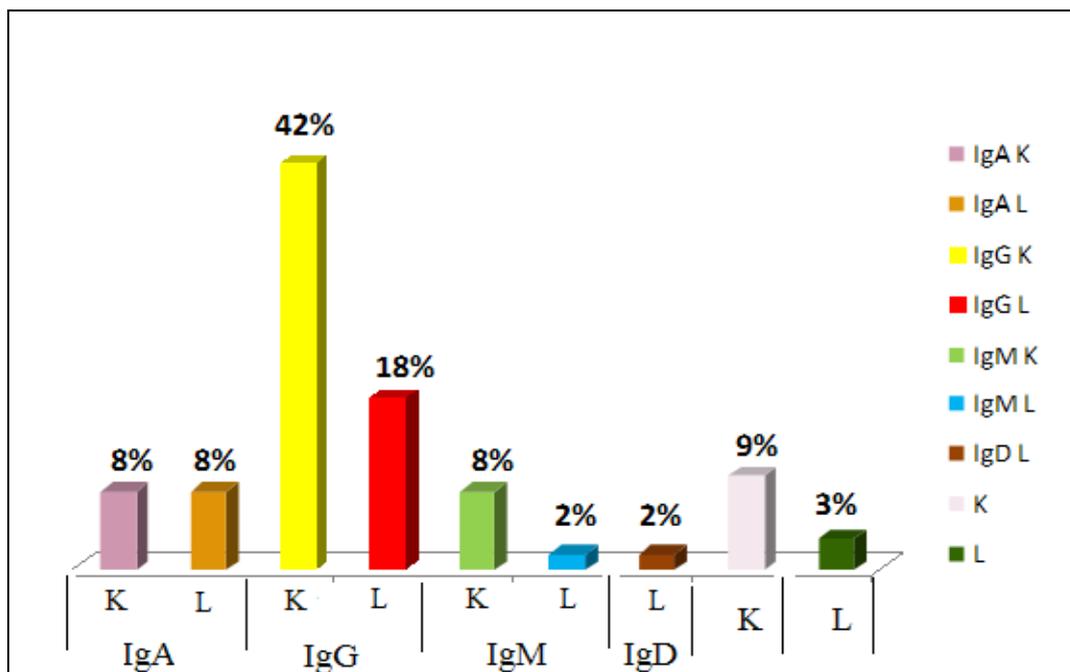


Figure 12 : Répartition des électrophorèses selon la classe et le type des immunoglobulines.

➤ Cette figure, montre que la majorité des immunoglobulines qui ont révélées une gammopathie, sont des IgG de type kappa (42%) et lambda (18%), suivies des chaînes légères kappa (9%), des IgA de type kappa et lambda (8%), et des IgM de type kappa (figure 12).

a) Pour les pics biconales en gamma globulines :

	Effectif	Pourcentage (%)
Pic biconal en gamma IgG L	3	34
Pic biconal en gamma IgM K	2	22
Pic biconal en gamma IgG K	1	11
Pic biconal en gamma IgG KL	1	11
Pic biconal en gamma IgG K – IgM K	1	11
Pic biconal en gamma IgG L – IgM L	1	11

Tableau 13 : Répartition des électrophorèses selon la classe et le type des immunoglobulines.

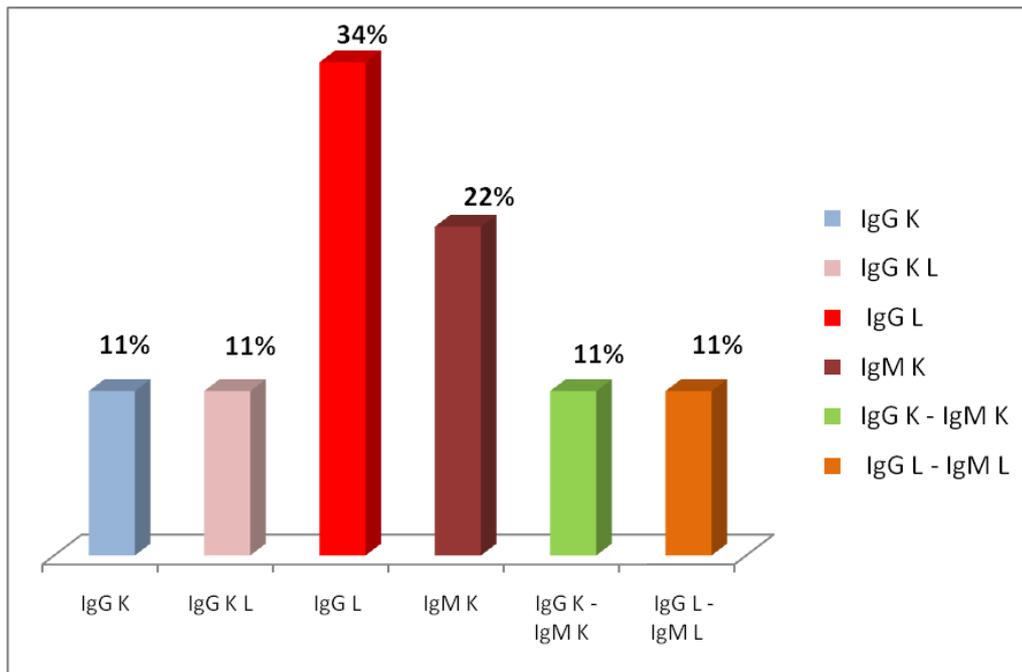


Figure 13 : Répartition des électrophorèses selon la classe et le type des immunoglobulines.

➤ D'après la figure 13, la majorité des immunoglobulines qui ont révélées une gammopathie biclonale, sont des IgG de type lambda (34%), suivies des IgM de type kappa (22%).

b) Pour les hypogammaglobulinémies :

	Effectif	Pourcentage (%)
<i>Hypogammaglobulinémie K</i>	6	55
<i>Hypogammaglobulinémie IgA K</i>	2	18
<i>Hypogammaglobulinémie IgM K</i>	1	9
<i>Hypogammaglobulinémie IgM L</i>	1	9
<i>Hypogammaglobulinémie IgG K</i>	1	9

Tableau 14 : Répartition des électrophorèses selon la classe et le type des immunoglobulines.

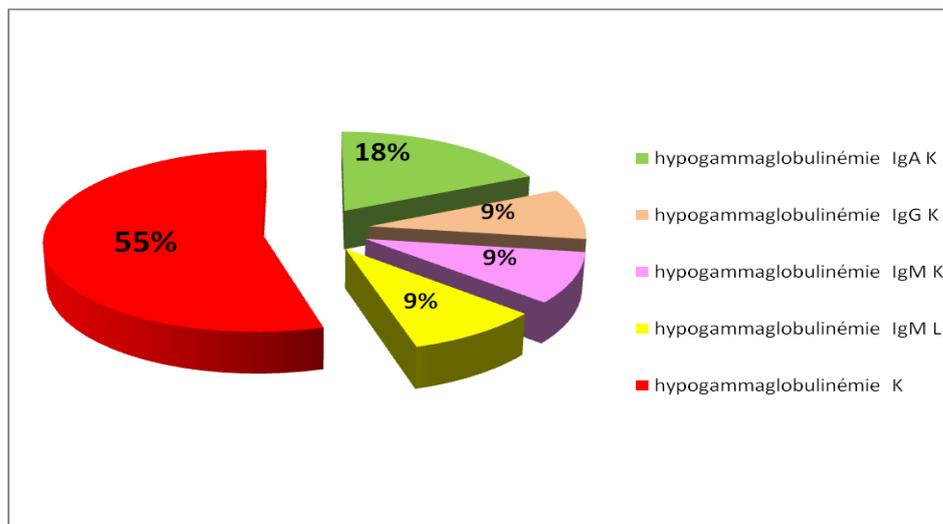


Figure 14 : Répartition des électrophorèses selon la classe et le type des immunoglobulines.

➤ D'après la figure 14, la majorité des immunoglobulines qui ont révélées une hypogammaglobulinémie, sont des chaînes légères kappa (55%).

c) Pour les pics monoclonaux en gamma globulines :

	Effectif	Pourcentage (%)
Pic monoclonal en gamma IgG K	21	49.9
Pic monoclonal en gamma IgG L	7	16.6
Pic monoclonal en bêta IgA L	3	7.1
Pic monoclonal en gamma L	2	4.8
Pic monoclonal en gamma et bêta IgG K – IgA K	2	4,8
Pic monoclonal en gamma IgA L	2	4.8
Pic monoclonal en bêta IgA K	1	2.4
Pic monoclonal en bêta IgM K	1	2.4
Pic monoclonal en gamma IgD L	1	2,4
Pic monoclonal en gamma IgA K	1	2.4
Pic monoclonal en gamma IgM K	1	2.4

Tableau 15 : Répartition selon la classe et le type des immunoglobulines.

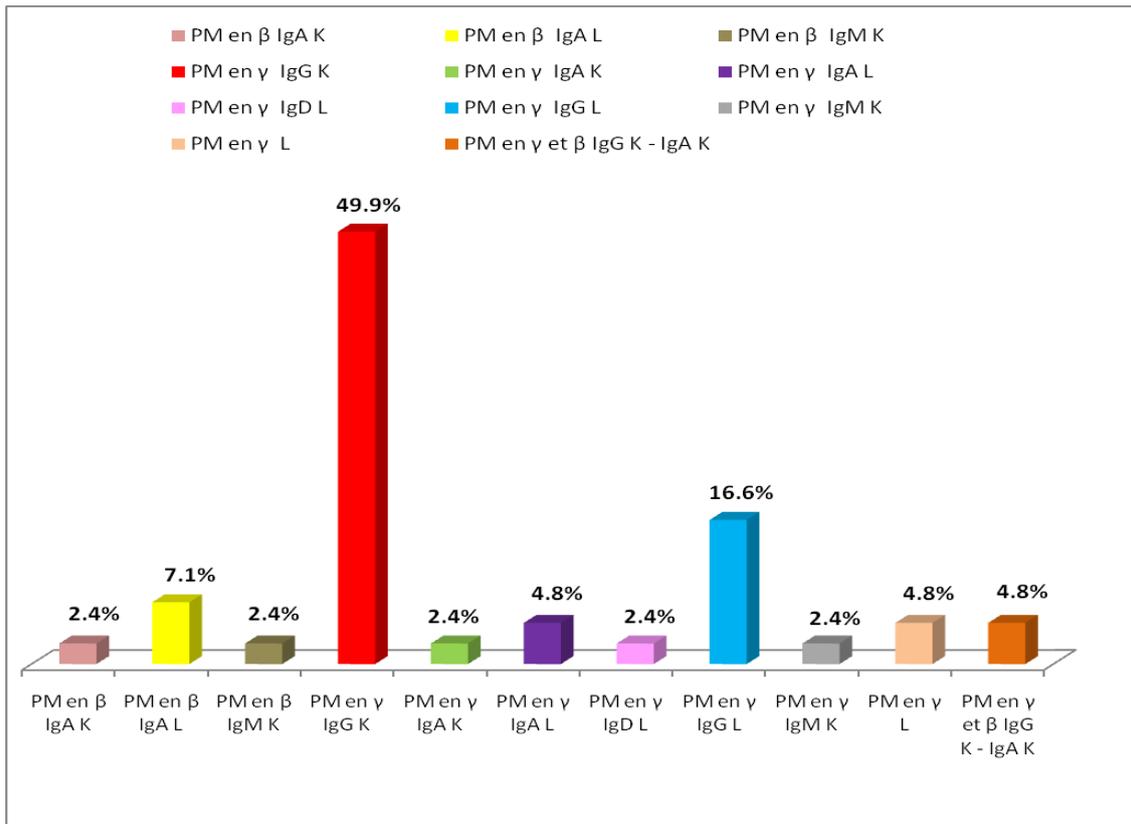


Figure 15 : Répartition des électrophorèses selon la classe et le type des immunoglobulines.

➤ D'après la figure 15, la majorité des immunoglobulines qui ont révélées une gammopathie monoclonale, sont des IgG de type kappa (49.9%) et lambda (16.6%).

Discussion

D'après les résultats obtenus, on peut tirer les constatations suivantes :

- L'ensemble de l'étude porte sur 1743 personnes, dont l'effectif des patients de sexe féminin est supérieur aux patients de sexe masculin (944 versus 799, +8%).
- En ce qui concerne l'âge des patients, nous avons remarqué :
 - 31% des personnes participantes sont âgées entre 45 et 60 ans.
 - Une répartition relativement homogène entre les différentes tranches d'âges (de 0 à 100).
 - Une moyenne d'âge de 45.1824 ans.
 - Une médiane de l'ordre de 48 ans.
 - Une mode de l'ordre de 60 ans.
- Plus du 1/4 des patients participants proviennent du service de gastrologie, ceci montre bien l'intérêt de ce genre d'analyse vis-à-vis du service.
- Presque la moitié de ces personnes participantes proviennent de ces 4 services : médecine interne, rhumatologie, externe et néphrologie.
- Les personnes ayant un profil électrophorétique anormal sont majoritaires avec un effectif de l'ordre de 1380 versus 363 (profil normal). Ceci pourra justifier la prescription de cette demande d'analyses par les médecins traitants.
 - 79% de ces personnes à profil électrophorétique anormal sont caractérisées par une inflammation (56%), une hypergammaglobulinémie (21%) et une hypoalbuminémie (12%).
 - Au sein des personnes atteintes d'inflammation, l'inflammation chronique est plus répandue que celle aiguë (425 versus 348, +10%).
 - 301 patients étudiés sont atteints des gammopathies dont l'hypergammaglobulinémie polyclonale caractérise la majorité de ces patients (79%).
 - 21% de ces personnes ayant une gammopathie sont caractérisés par des pics monoclonaux en zone gamma ou bêta globulines, des pics biclonales et des hypogammaglobulinémies. Ces patients proviennent essentiellement des services suivants : Médecine interne, néphrologie, externe et gastrologie.
 - Nous constatons également que la majorité de ces personnes ont plus de 40 ans, ceci pourra nous faire penser que l'âge influence d'une façon notable la gammopathie.
 - 55% des patients atteints d'une gammopathie sont de sexe masculin par rapport au sexe féminin (45%).
 - la moyenne d'âge = 54.4677ans ; la médiane = 59.5 ans ; la mode = 61 ans.
 - 44% de ces personnes ont une protidémie située entre 60 et 80 g/l, suivie de 39% ont une protidémie supérieure à 80 g/l, on peut donc déduire qu'une protidémie normale ou supérieure pourra être en lien direct avec une gammopathie.

- La majorité des Ig qui ont révélées une gammapathie sont des IgG de type kappa et lambda, suivies des chaînes légères kappa, des IgA et des IgM.
- 34 % des IgG de type lambda ont révélés une gammapathie biclonale, tandis que 49.9% des IgG de type kappa ont révélés une gammapathie monoclonale.
- 55% des chaînes légères kappa ont révélés une hypogammaglobulinémie. Ces résultats sont logiques du fait qu'ils sont proportionnels à leurs concentrations sériques.

Conclusion

Ce stage m'a été très bénéfique. Il m'a permis d'avoir un aperçu sur le monde socioprofessionnel, d'enrichir mes connaissances dans le domaine médical et de m'initier à l'esprit de recherche scientifique.

Cette expérience enrichissante m'a permis surtout d'apprendre la technique de dosage des protéines sériques, de l'immunofixation ainsi que l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Au point de vue épidémiologique, l'ensemble de cette étude nous a permis de distinguer les faits marquants suivants :

- ❖ Le service de Gastrologie est le service le plus demandeur de ce genre d'analyse de profil électrophorétique. Ceci peut être expliqué par l'importance de la technique d'électrophorèse des protéines sériques dans la détection des maladies liées à la nutrition (malabsorption...), les maladies du foie, les maladies infectieuses avec notamment les pathologies virales dont les hépatites B et C.
- ❖ Aucune différence significative n'a été établie entre les variables âge et sexe des patients et les services de soin qui ont commandé ce genre d'analyses.
- ❖ Les résultats obtenus ont montré que les patients diagnostiqués ont 3 fois plus un profil électrophorétique anormal que normal. La majorité de ces personnes à profil anormal souffrent essentiellement d'une inflammation chronique.
- ❖ En cas des gammopathies : les patients atteints des gammopathies proviennent essentiellement du service de médecine interne. Ils sont majoritairement de sexe masculin. 1/5 de ces patients sont des personnes âgées de plus de 40 ans avec une protidémie normale (44%). Les immunoglobulines les plus répandues sont des IgG de type kappa et lambda.

En conclusion générale, cette étude rétrospective a permis d'élucider des points très importants dans la compréhension de la corrélation de plusieurs paramètres impliqués dans la caractérisation du profil électrophorétique anormal. Cependant, des contraintes nous ont empêchées d'exploiter au mieux nos analyses :

- Clinique : manque de renseignements cliniques relatifs aux patients.
- Administrative : insuffisance de ma période de stage pour mener à terme dans les meilleures conditions des analyses biostatistiques de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- 2) Lubert Stryer, Jeremy Mark Berg, John L. Tymoczko, Biochimie, Flammarion, « Médecine Sciences », Paris 2003.
- 4) Cours d'immunologie, LST/ Biologie et Santé, 2010/2011.
- 6) Didier le Carrer. Electrophorèse et immunofixation des protéines sériques : Interprétation illustrées, laboratoire Sebia.
- 7) P. Valdiguié, Biochimie clinique.
- 8) Université Médicale Virtuelle Francophone, 2008-2009
- 9) Notice d'utilisation Sebia, HYDRAGEL 1, 2, 4 et 9 IF, 2010/01.
- 10) Notice d'utilisation Sebia, HYDRAGEL 7, 15 et 30 β 1 β 2, 2009/12.

WEBIOGRAPHIE

- 1) http://fr.wikipedia.org/wiki/Plasma_sanguin.
- 3) <http://www.arnobio2.com>.
- 5) <http://biotechnologie.over-blog.com>.