

# **I. Généralités sur l'électrophorèse des protéines sériques**

## **A. Principe de l'électrophorèse des protéines sériques**

L'électrophorèse est une méthode classique de séparation de protéines, d'ADN ou d'ARN. Ces molécules sont soumises à un champ électrique dans une phase liquide. Leur séparation repose sur leurs différences de charge, de taille et de structure (LENDER *et al.*, 1994). 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  $\text{COO}^-$ ). 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) (KANEKO *et al.*, 2008). L'albumine porte une importante charge négative : c'est elle qui 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 ( $\alpha$ -globulines,  $\beta$ -globulines,  $\gamma$ -globulines). Les  $\alpha$ -globulines migrent le plus loin tandis que les  $\gamma$ -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 (THOMAS, 2000 b).

Après la migration, les protéines sont colorées (rouge ponceau, bleu de coomassie ou noir amido 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 (BUSH, 1991). L'aspect de l'électrophorégramme peut déjà apporter de nombreuses informations et être évocateur de certaines affections.

L'électrophorèse peut être utilisée pour tous les liquides biologiques contenant des protéines : sérum, urines, LCR, larmes, fèces, liquide d'épanchement (GROULADE, 1978 a). Pour

réaliser une électrophorèse des protéines contenues dans les urines ou dans le liquide céphalo-rachidien, les techniques mises en œuvre seront sensiblement différentes (RIVIERE, 1988).

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'agar, gel d'amidon, gel de polyacrylamide... (MORETTI, 1999),
- l'électrophorèse haute résolution, permettant la séparation des protéines d'une même zone électrophorétique en bandes individuelles (ABATE *et al.*, 2000),
- l'électrophorèse bidimensionnelle,
- l'immunoélectrophorèse, fondée sur les propriétés antigéniques des protéines (MORETTI, 1999).

Dans la suite de ce travail, nous ne traiterons que de l'électrophorèse sur gel d'agarose.

## B. Historique de l'électrophorèse des protéines sériques

En 1859, l'allemand Georg Hermann QUINCKE (1834-1924) découvre qu'il est possible de déplacer des particules colloïdales (sous forme de colle gélatineuse) sous l'action d'un champ électrique : ce phénomène est appelé cataphorèse.

Par la suite, Hermann Von HELMHOLTZ (1821-1894) développe l'électro-osmose : sous un champ électrique, il observe que des particules chargées se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge.

En 1892, S.E. LINDER et H. PICTON imaginent, eux, d'exploiter cette observation pour la séparation de particules chargées.

En 1937, c'est le Suédois Arne Wilhelm Kaurin TISELIUS (1902-1971) qui met en œuvre cette technique de séparation pour les protéines du sérum sanguin et du lait, ce qui lui vaudra le prix Nobel en 1948 (MAGNIEZ, 2008). Sa méthode de fractionnement en phase liquide est alors trop

onéreuse en matériel et en personnel pour la pratique courante. Il la perfectionne et, en 1950, il met au point l'électrophorèse sur papier, plus simple et permettant une utilisation plus large (GROULADE, 1978 b).

Depuis cette technique n'a cessé d'être améliorée grâce à de nouveaux supports et de nouvelles techniques de réalisation. Elle est devenue un outil indispensable dans de nombreux laboratoires, tant au niveau de la recherche et de l'industrie que des sciences médicales au sens large. En médecine vétérinaire, elle est utilisée dans des domaines aussi variés que la médecine interne, la cancérologie, la néphrologie, la parasitologie ou la gastro-entérologie.

### C. Indications de l'électrophorèse des protéines sériques

L'électrophorèse des protéines sériques est un outil de qualité pour le praticien et un examen au coût modéré pour le propriétaire. Si elle n'est pas à mettre en œuvre en première intention, elle est toutefois extrêmement utile dans la démarche diagnostique, le pronostic et le suivi de nombreuses affections (FOULON *et al.*, 1996).

Cependant, elle reste peu utilisée en pratique courante du fait de la méconnaissance des techniques d'interprétation et de son allure rébarbative : un tracé étrange, des symboles grecs et de nombreux pourcentages. L'électrophorèse des protéines sériques est pourtant indiquée :

- lors du diagnostic d'une affection susceptible de modifier la répartition des protéines sériques,
- lorsqu'on constate une modification de la protidémie (augmentation ou diminution), afin d'apprécier les fractions affectées (TRUMEL *et al.*, 1996),
- lors de la réalisation d'un bilan hépatique complet,
- lors de la réalisation d'un bilan gériatrique complet (BATAMUZI *et al.*, 1996),
- lors de troubles infectieux d'évolution inhabituelle,
- dans tous les cas où le praticien se trouve face à un animal dont l'état général est altéré sans connaître précisément la cause de cette altération (GROULADE, 1978b).

## D. Autres techniques d'analyses d'intérêt similaire

L'électrophorèse des protéines sériques fait partie d'un ensemble de techniques d'analyses mettant en évidence l'existence de phénomènes inflammatoires. Si la vitesse de sédimentation est un examen ancien et limité dans ses intérêts, il convient de s'attarder sur le dosage de la protéine C réactive.

### 1. Vitesse de sédimentation

La vitesse de sédimentation est un examen de routine de première évaluation d'un processus inflammatoire. Elle permet l'évaluation globale des phénomènes protéiques et hématologiques du syndrome inflammatoire (MEDAILLE, 2002).

#### a) Réalisation pratique

La technique de mesure la plus utilisée est la méthode dite de Westergreen. Le sang, prélevé sur tube citaté, est aspiré, sans bulle d'air, dans un tube rectiligne et gradué, de 2,55 mm de diamètre et de 300 mm de longueur. Le tube est placé à température ambiante sur un portoir vertical permettant l'obturation de son extrémité inférieure. La lecture de la hauteur du plasma surnageant sans globules rouges est effectuée à 1 heure et à 2 heures. La sédimentation est la distance parcourue par les hématies laissant le plasma surnageant. Les résultats sont exprimés en mm (MEDAILLE, 2002).

## b) Intérêt

La vitesse de sédimentation est le marqueur de première intention d'un syndrome inflammatoire. Elle se trouve augmentée dans le cas de lésions tissulaires et d'inflammation (COLES, 1979). Elle présente une bonne valeur pronostique : une amélioration clinique accompagnée d'une vitesse de sédimentation normale est de bon pronostic (MEDAILLE, 2002). Elle est également utile lors du suivi d'un patient. Cependant, elle n'aide en aucun cas le praticien pour l'élaboration de son diagnostic (COLES, 1979) et elle est peu sensible et peu spécifique (MEDAILLE, 2002).

## 2. Protéine C réactive

La protéine C réactive fait partie des protéines de la phase aiguë, protéines dont la concentration augmente d'au moins 25 % dans les sept jours suivant le début d'un processus inflammatoire. Comme chez l'homme, c'est l'une des représentantes les plus importantes de ce groupe chez le chien, le chat et le cheval (KENT, 1992). C'est un excellent marqueur non spécifique synthétisé par le foie. Sa cinétique rapide s'accompagne d'une augmentation significative de la concentration plasmatique lors de processus inflammatoires d'étiologie variée (GILLET, 2002). En revanche, chez les ruminants, elle n'est pas considérée comme une protéine de la phase aiguë. On utilise préférentiellement l'haptoglobine comme marqueur de l'inflammation chez les bovins et ovins (HUMBLET et GODEAU, 2005).

## a) Historique

La protéine C réactive a été décrite pour la première fois par TILLET et FRANCIS en 1930 (YAMAMOTO *et al.*, 1992). Lors d'études portant sur des patients souffrant de pneumonie aiguë à pneumocoques, elle a été découverte dans les sérums comme une fraction précipitant le

polysaccharide C du pneumocoque. C'est pourquoi elle fut nommée protéine C réactive. Chez l'homme, son dosage est fréquent lors de phénomènes inflammatoires aigus, grâce à l'élaboration de méthodes sensibles et spécifiques. Ce n'est qu'en 1984 que les travaux de CASPI *et al.* confirment l'existence d'une protéine C réactive canine analogue à la protéine humaine (GILLET, 2002).

b) Intérêt

Le rôle principal de la protéine C réactive dans l'organisme est de dégrader le contenu nucléaire des cellules endommagées. Elle se fixe également à certains composants de la membrane de cellules infectieuses et permet l'activation du complément.

La protéine C réactive est détectable dans le sang, même pour de très légers phénomènes inflammatoires, avant toute modification hématologique (ECKERSALL ET CONNER, 1988). En médecine humaine, le dosage de la protéine C réactive est très utilisé par le praticien dans :

- l'aide au diagnostic : dépistage d'infections bactériennes dans des conditions cliniques difficiles, orientation étiologique du diagnostic,
- l'aide au pronostic : la protéine C réactive est un témoin de la réaction de l'organisme face à une agression de sévérité variable,
- la surveillance thérapeutique : la protéine C réactive est un marqueur précis et rapide (VERGOBBI, 1992).

## II. Les fractions électrophorétiques

### A. Albumine

L'albumine est la plus abondante des protéines plasmatiques. Elle représente 35 à 50 % des protéines du sérum chez le chien (JAIN, 1993). C'est une protéine de grande taille, osmotiquement active, d'un poids approximatif de 69 000 daltons (MC GROTTY et KNOTTENBELT, 2002).

#### 1. Métabolisme et catabolisme

L'albumine est synthétisée au niveau du foie (TRUMEL *et al.*, 1996) par 10 à 35 % des hépatocytes, à partir des protéines alimentaires ingérées par l'animal. 65 à 90 % des hépatocytes sont donc « en attente » et permettent à l'organisme de compenser rapidement une importante perte en faisant produire de l'albumine à ces hépatocytes de réserve (GROULADE 1985). Cette synthèse hépatique est sous la régulation de l'interleukine 1 (IL-1) et d'autres cytokines (JAIN, 1993).

Le catabolisme de l'albumine est réalisé par les organes à haute activité métabolique : rein, foie, rate, ganglions, muscles (GROULADE, 1978 a).

#### 2. Propriétés et fonctions

L'albumine, du fait de sa grande taille et de son abondance, joue un rôle très important dans la régulation et le maintien de la pression oncotique sanguine (JAIN, 1993) : près de 75 % de la pression oncotique est sous la régulation de l'albumine. Ainsi, toute baisse de sa concentration expose l'individu à des risques d'hypotension, d'œdèmes ou d'épanchements (MC GROTTY et KNOTTENBELT, 2002).

L'autre grande fonction de l'albumine est le transport, via la liaison à de nombreuses autres molécules dont elle se charge :

- les acides gras libres,
- les acides biliaires,
- la bilirubine non conjuguée,
- les porphyrines,
- la thyroxine (STOCKHAM et SCOTT, 2002),
- les kétostéroïdes,
- de nombreux médicaments comme la pénicilline, l'aspirine, les barbituriques,
- l'histamine,
- certains ions : calcium, magnésium (STOCKHAM et SCOTT, 2002), zinc (JAIN, 1993).

L'albumine permet le transport dans le plasma aqueux de certaines molécules liposolubles. Elle est donc indispensable à un grand nombre de mouvements de molécules au sein de l'organisme. De plus, en se liant à certains constituants, l'albumine évite leur fuite rénale (KANEKO *et al.*, 2008).

## B. Globulines

### 1. $\alpha$ -globulines

Les protéines les plus importantes des  $\alpha$ -globulines se retrouvent majoritairement au sein des  $\alpha_2$ -globulines avec notamment :

- des protéines de l'inflammation :  $\alpha_2$ -macroglobuline, haptoglobine, céruloplasmine,
- des lipoprotéines : High Density Lipoprotein (HDL) (TRUMEL *et al.*, 1996).

#### a) Métabolisme des $\alpha$ -globulines

Les  $\alpha$ -globulines sont synthétisées au niveau du foie (TRUMEL *et al.*, 1996).

## b) Propriétés et fonctions des $\alpha$ -globulines

Les  $\alpha$ 1-globulines ont des rôles spécifiques selon les protéines qui les composent. Ainsi :

- l' $\alpha$ 1-lipoprotéine a un rôle de transporteur des lipides, en particulier du cholestérol, sous la forme de High Density Lipoprotein (HDL) (STOCKHAM et SCOTT, 2002),
- l' $\alpha$ 1-antitrypsine et l' $\alpha$ 1-antichymotrypsine ont pour fonction d'inactiver les protéases, dont la trypsine et la chymotrypsine, et possèdent donc une action anti-inflammatoire (STOCKHAM et SCOTT, 2002),
- l'acide  $\alpha$ 1-glycoprotéine a un rôle d'immunorégulation encore peu connu (THOMAS, 2000 a),
- la globuline liant la thyroxine a, comme son nom l'indique, la fonction de se lier à la thyroxine et de la transporter,
- l' $\alpha$ 1-antithrombine III a pour fonction d'inhiber la thrombine (KANEKO *et al.*, 2008) : on peut doser spécifiquement l'anti-thrombine III lors de l'exploration de l'hémostase.

Les  $\alpha$ 2-globulines se composent de plusieurs protéines aux fonctions très différentes :

- l' $\alpha$ 2-macroglobuline inactive les protéases et possède donc un rôle anti-inflammatoire (STOCKHAM et SCOTT, 2002). De plus, elle se lie à l'insuline et en permet le transport (KANEKO *et al.*, 2008),
- l'haptoglobine se lie à l'hémoglobine libre et permet ainsi son transport (STOCKHAM et SCOTT, 2002),
- la transcortine qui se lie au cortisol (BUSH, 1991),
- la céruloplasmine permet le transport du cuivre,
- l' $\alpha$ 2-lipoprotéine a un rôle de transporteur des lipides et en particulier des Very Low Density Lipoprotein (VLDL) (KANEKO *et al.*, 2008).

## 2. $\beta$ -globulines

Les  $\beta$ -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,
- des lipoprotéines : Very Low Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein (LDL).

a) Métabolisme des  $\beta$ -globulines

Les  $\beta$ -globulines sont majoritairement synthétisées au niveau du foie. Les cellules plasmocytaires participent également à cette synthèse (TRUMEL *et al.*, 1996).

b) Propriétés et fonctions des  $\beta$ -globulines

La protéine la plus importante dans la sous-fraction des  $\beta$ 1-globulines est la transferrine. Elle a pour fonction de se lier au fer et d'en permettre le transport vers la moelle érythropoïétique (STOCKHAM et SCOTT, 2002). La ferritine participe elle aussi au transport du fer (KANEKO *et al.*, 2008). L'hémopexine est une autre protéine retrouvée dans la sous-fraction des  $\beta$ 1-globulines. Cette protéine, qui joue un rôle dans le transport de l'hématine (produit de dégradation de l'hème), est dosée parallèlement à l'haptoglobine pour caractériser des hémolyses.

La sous-fraction des  $\beta$ 2-globulines comporte plusieurs protéines d'importance dont :

- la  $\beta$ -lipoprotéine, aussi appelé LDL, ayant pour fonction le transport des lipides dont le cholestérol (STOCKHAM et SCOTT, 2002),
- la protéine C3 du complément permettant l'initiation de l'inflammation,
- les immunoglobulines M (sécrétées par les plasmocytes lors d'un premier contact avec un antigène) et A (retrouvées dans diverses sécrétions biologiques, elles empêchent les agents pathogènes de se fixer aux cellules, plus spécifiquement aux cellules de recouvrement des muqueuses et de l'épiderme) (STOCKHAM et SCOTT, 2002),
- le fibrinogène qui, en tant que précurseur de la fibrine, joue un rôle important dans la coagulation,

•la protéine C réactive (voir supra) dont le rôle est d'activer le complément et qui est très utilisée en médecine humaine, car considérée comme la protéine permettant le mieux de diagnostiquer l'inflammation aiguë (KANEKO *et al.*, 2008).

### 3. $\gamma$ -globulines

Avec des protéines d'un poids de 156 000 daltons en moyenne (MC GROTTY et KNOTTENBELT, 2002), la fraction des  $\gamma$ -globulines regroupe différentes immunoglobulines dont les plus importantes sont les immunoglobulines A, E et G (TRUMEL *et al.*, 1996).

#### a) Métabolisme des $\gamma$ -globulines

Les  $\gamma$ -globulines sont synthétisées au niveau des cellules plasmatiques et des lymphocytes B dans les tissus lymphoïdes, en réponse à une stimulation antigénique (BUSH, 1991).

#### b) Propriétés et fonctions des $\gamma$ -globulines

La fraction  $\gamma$  des globulines comporte plusieurs protéines d'importance :

- les immunoglobulines G, dont la fonction est de se lier à ses antigènes spécifiques (STOCKHAM et SCOTT, 2002) en réponse à des toxines ou des agents infectieux (KANEKO *et al.*, 2008). Elles fixent - pour certaines - le complément et participent à la réponse mémoire,
- les immunoglobulines A,
- les immunoglobulines E, dont la fonction est essentielle au cours des phénomènes allergiques ou de parasitisme digestif (KANEKO *et al.*, 2008).