

II. Résultats

A. Etude de la dilution

La dilution est une étape importante. Elle permet de limiter l'effet de saturation de l'albumine. Il est important de choisir un solvant inerte vis-à-vis du sérum et ses composants. Le fabricant recommande une dilution au quart avec du NaCl 0,9%.

1. Le solvant de dilution

Pour des raisons pratiques, on souhaite utiliser de l'eau distillée à la place du NaCl comme solvant de dilution. Ce solvant peut-il être utilisé ? N'entraîne-t-il pas des modifications des résultats de l'électrophorèse ?

Trois sérums de chien ont été utilisés pour étudier cet impact sur l'électrophorèse des protéines. Chaque sérum a été dilué au quart dans une solution de NaCl 0,9% et dans une solution d'eau distillée. Les dilutions ont ensuite été soumises à une électrophorèse, puis les résultats sont interprétés grâce au logiciel d'analyse.

Les figures 9, 10 et 11 montrent l'aspect du gel et l'électrophorégramme obtenus.

Figure 9 : Aspect du gel et protéinogramme de la chienne 7087110 à partir de sérum dilué dans du NaCl 0,9% (courbe noire) et dans de l'eau distillée (courbe verte).

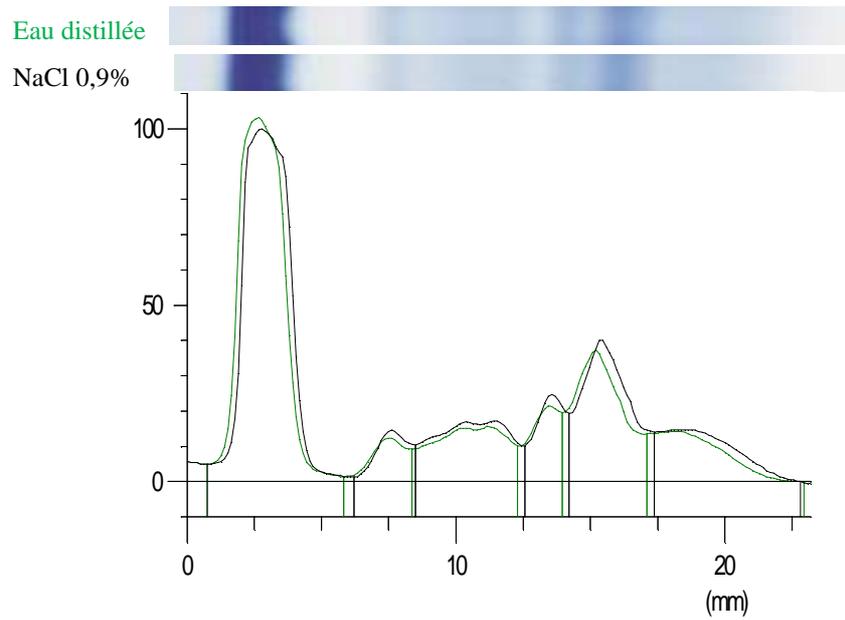


Figure 10 : Aspect du gel et protéinogramme de la chienne Tara à partir de sérum dilué dans du NaCl 0,9% (courbe noire) et dans de l'eau distillée (courbe verte).

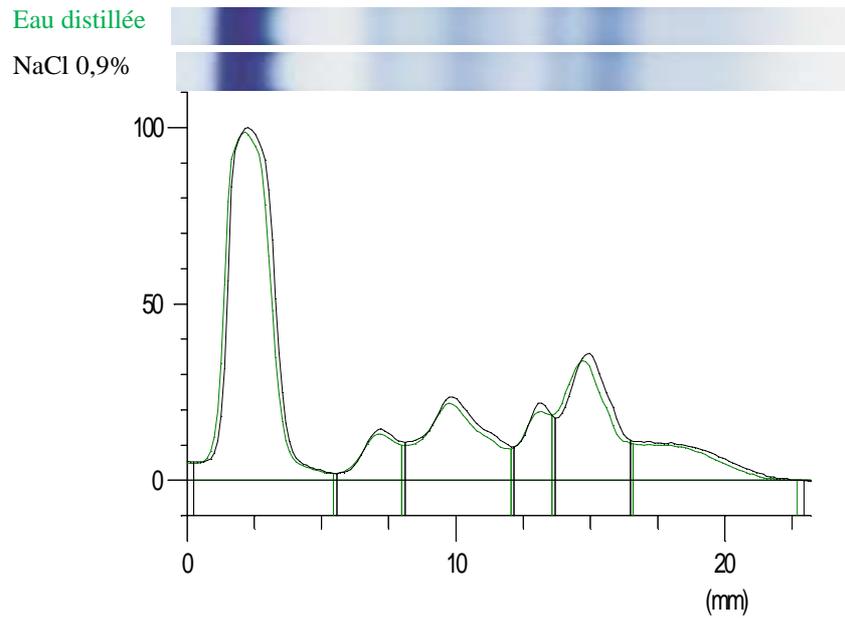
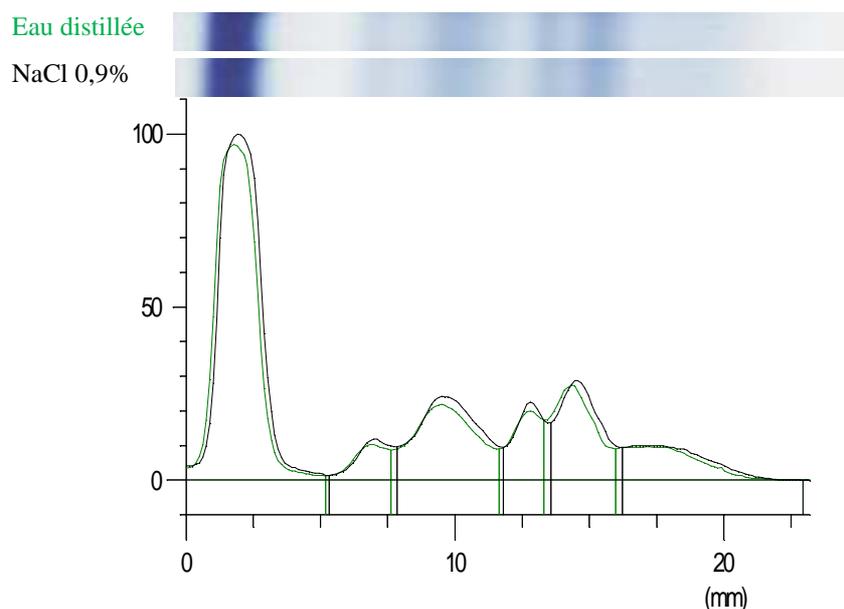


Figure 11 : Aspect du gel et protéinogramme de la chienne FAZ13 à partir de sérum dilué dans du NaCl 0,9% (courbe noire) et dans de l'eau distillée (courbe verte).



Nous constatons que les protéinogrammes obtenus par dilution dans le NaCl 0,9% et dans l'eau distillée se superposent. Il est à noter tout de même que les courbes obtenues avec l'eau distillée (courbes vertes sur les figures 9 à 11) sont toujours légèrement en dessous des courbes correspondant au NaCl. Cependant cette différence n'est pas significative du point de vue de l'interprétation diagnostique. Pour des raisons pratiques, nous utiliserons donc l'eau distillée dans le protocole d'analyse par électrophorèse.

2. Le degré de dilution

Les préconisations du fabricant s'appliquent à la médecine humaine et aux sérums d'origine humaine. On peut se demander si ces recommandations peuvent s'appliquer aux sérums d'origine animale ou s'il n'est pas possible d'utiliser un autre degré de dilution plus adapté pour ces sérums.

Dans un premier temps, on a comparé les protéinogrammes obtenus avec des dilutions au quart et au huitième. Les figures 12 et 13 montrent les résultats obtenus.

Figure 12 : Aspect du gel et protéinogramme du sérum du chien Michel dilué au quart (courbe noire) et au huitième (courbe verte).

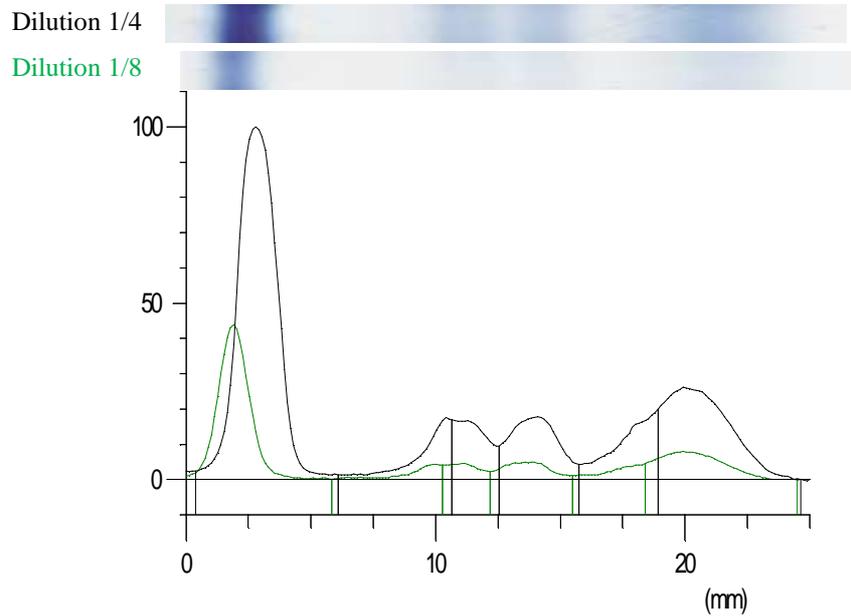
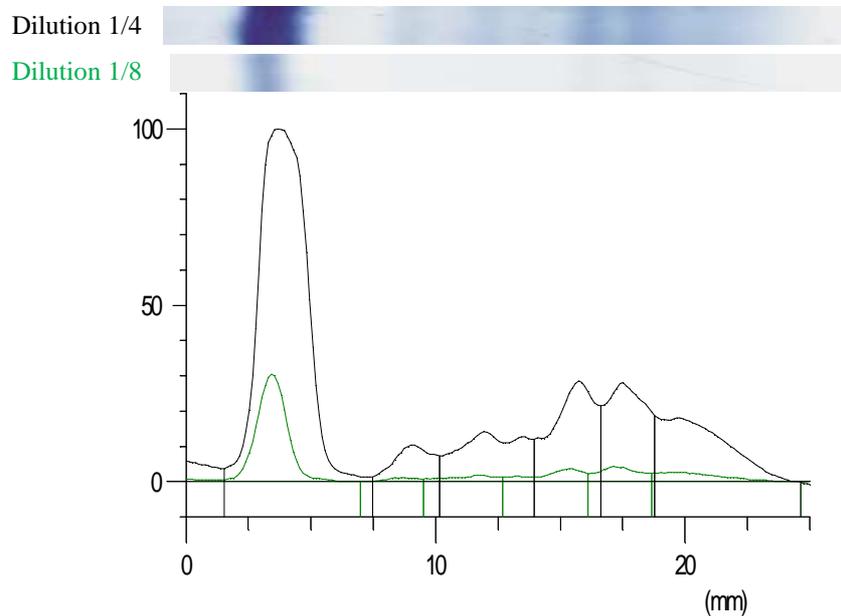


Figure 13 : Aspect du gel et protéinogramme du sérum du chien Tichit dilué au quart (courbe noire) et au huitième (courbe verte).



Nous pouvons constater une grande différence entre ces deux dilutions. La dilution au quart nous permet d'obtenir une bonne séparation des protéines avec des pics bien visibles et bien différenciés. Au contraire, la dilution au huitième donne un protéinogramme aplati. Certains pics sont même absents. Avec cette dilution, les concentrations en protéines sont trop

basses pour être bien détectées. La concentration au huitième est donc écartée pour notre protocole.

On a ensuite comparé des sérums dilués au quart et au cinquième. Les figures 14 et 15 présentent les résultats obtenus pour ces dilutions.

Figure 14 : Aspect du gel et protéinogramme du sérum de la chienne Fidgi dilué au quart (courbe noire) et au cinquième (courbe verte).

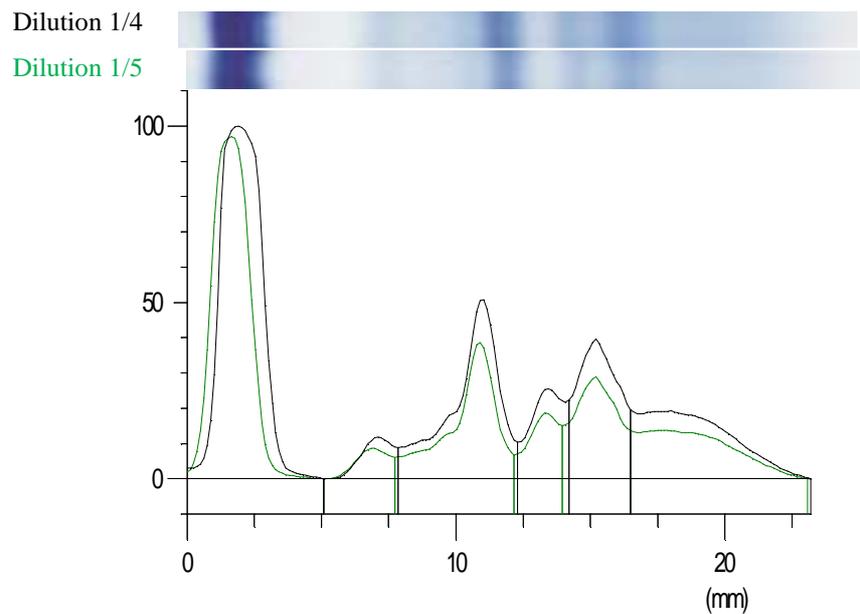
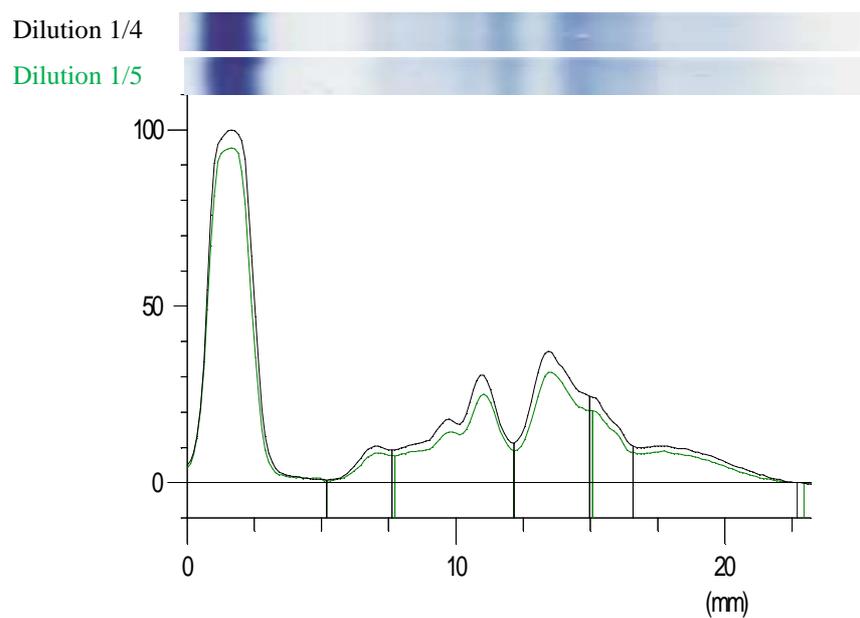


Figure 15 : Aspect du gel et protéinogramme du sérum de la chienne FA10 dilué au quart (courbe noire) et au cinquième (courbe verte).



Nous constatons que les protéinogrammes obtenus avec des dilutions au quart et au cinquième sont sensiblement identiques. Les pics d'albumine obtenus avec la dilution au cinquième semblent être plus fins (1^{er} pic de gauche sur les figures 14 et 15). On peut donc penser que la dilution au cinquième permet de limiter le risque de saturation du signal de l'albumine et donc de sous-estimation de sa concentration. C'est pourquoi nous retenons l'utilisation d'une dilution au cinquième pour la suite de notre protocole.

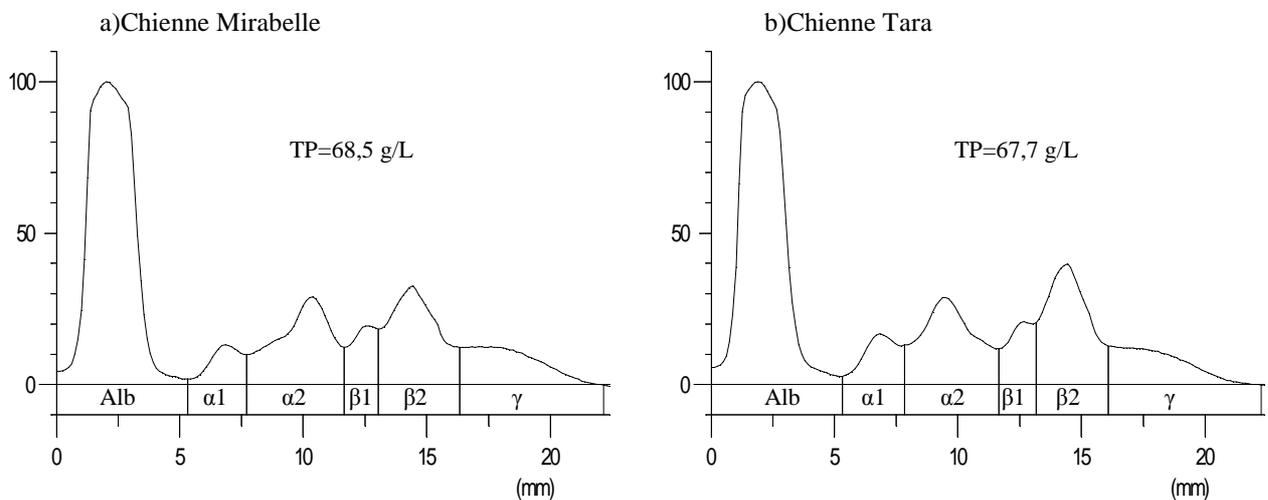
B. Etude par espèce

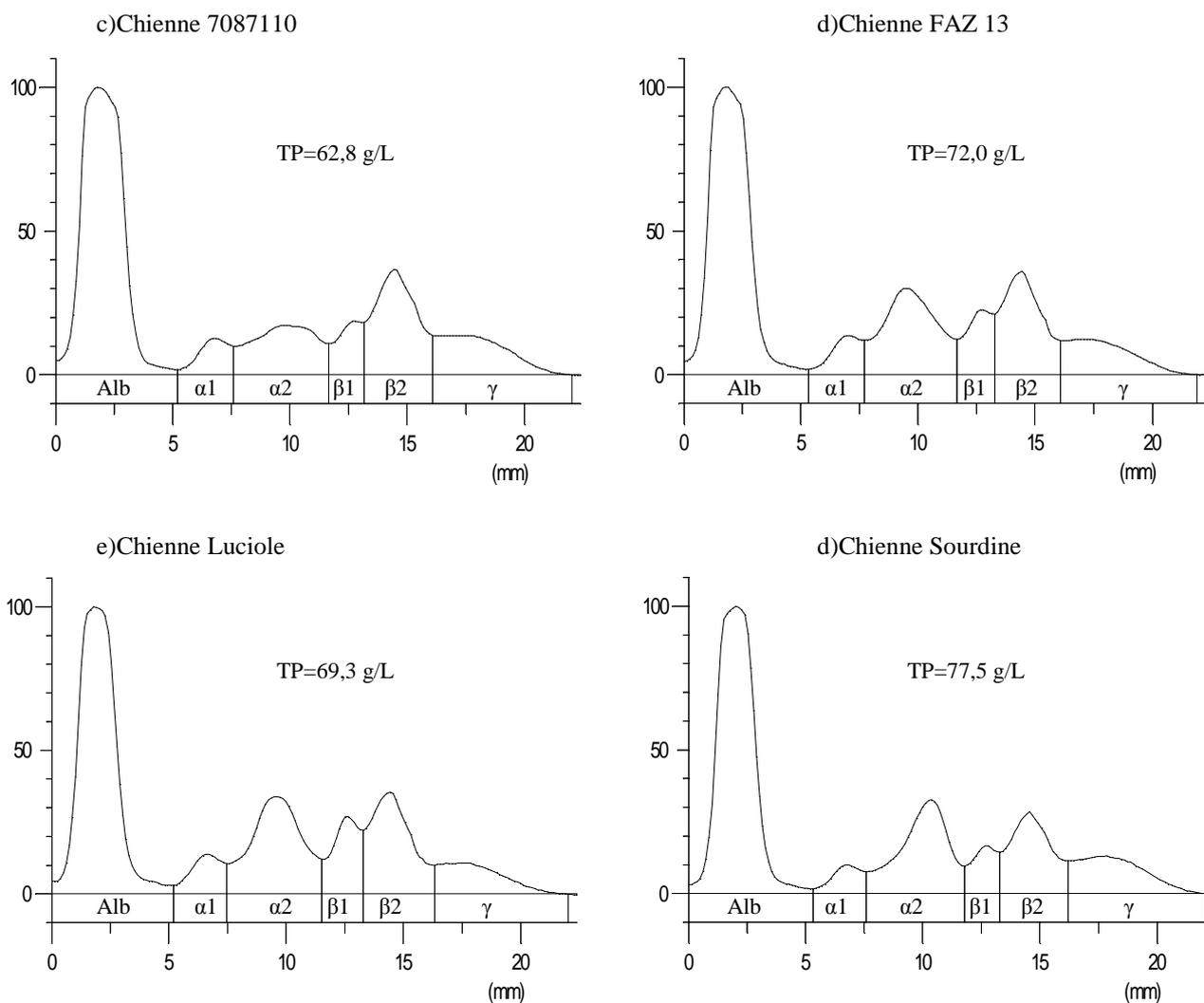
Pour chaque espèce, les objectifs étaient de définir des profils-type de l'électrophorèse des protéines sériques et de vérifier si l'on peut en tirer des valeurs usuelles.

1. Espèce canine

Nous avons utilisé le sérum de 6 chiennes Beagle. Les protéinogrammes correspondants, associés à leur valeur de protéines totales (TP), sont présentés dans la figure 16.

Figure 16 : Protéinogrammes des chiennes.





A partir de ces protéinogrammes, de la valeur de TP et à l'aide du logiciel Platinum, nous avons calculé (tableau 4) les concentrations des fractions de protéines en grammes par litres (g/L).

Tableau 4 : Résultats calculés des concentrations (g/L) des différentes fractions de protéines chez les chiennes.

CHIEN	Mirabelle	Tara	7087110	FAZ 13	Luciole	Sourdine
PROT. TOT.	68,5	67,7	62,8	72,0	69,3	77,5
ALBUMINE	33,4	31,3	30,4	32,7	29,7	36,1
ALPHA 1	3,0	4,1	2,9	3,4	3,5	2,9
ALPHA 2	10,7	10,5	8,2	13,0	13,8	14,6
BETA 1	3,5	3,9	3,4	4,9	5,7	4,0
BETA 2	11,1	11,7	10,8	11,2	11,2	11,0
GAMMA	6,7	6,2	7,1	6,7	5,4	8,8
Alb / Glob	0,95	0,86	0,94	0,83	0,75	0,87

On remarque que tous les profils obtenus sont très proches les uns des autres excepté pour la chienne 7087110 qui présente un pic α_2 anormalement bas. On décide donc d'exclure cette chienne pour la suite de l'étude.

Nous pouvons déjà décrire un profil type du protéinogramme chez le chien : les protéines sériques se séparent en 6 fractions (albumine, α_1 -globulines, α_2 -globulines, β_1 -globulines, β_2 -globulines et γ -globulines). Les pics α_2 et β_2 sont bien marqués.

Nous avons ensuite calculé pour chaque fraction la moyenne, l'écart-type et nous en avons déduit un intervalle de référence correspondant aux valeurs usuelles chez le chien. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 5 et nous procéderons ainsi pour chaque espèce étudiée.

Tableau 5 : Moyenne, écart-type et intervalle de référence (g/L) chez le chien.

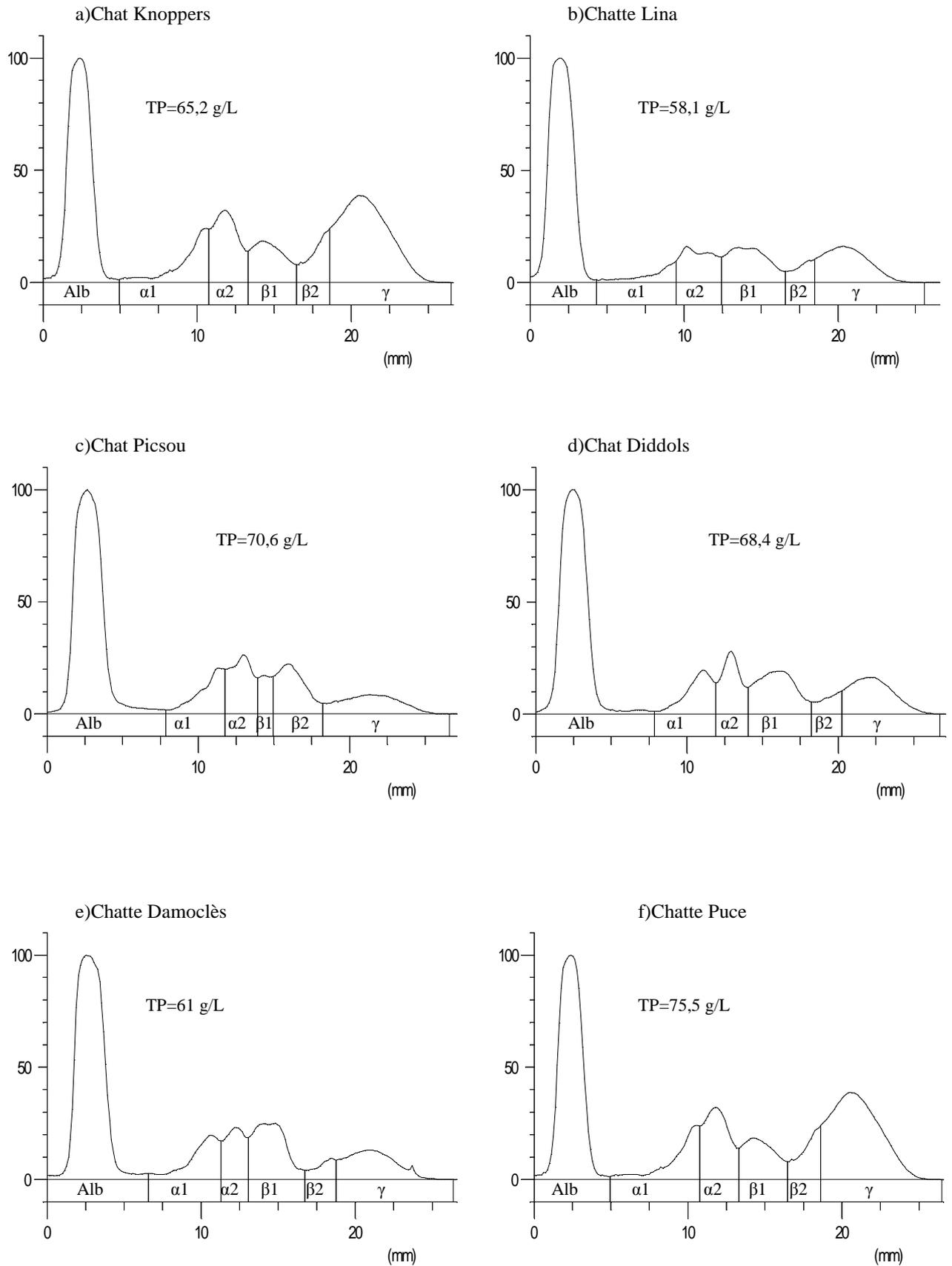
	MOYENNE	ECART-TYPE	INTERVALLE
PROT. TOT.	71,0	4,0	63,0 – 79,0
ALBUMINE	32,7	2,4	27,8 – 37,5
ALPHA 1	3,4	0,5	2,4 – 4,3
ALPHA 2	12,6	1,8	8,8 – 16,3
BETA 1	4,4	0,9	2,5 – 6,3
BETA 2	11,2	0,3	10,7 – 11,7
GAMMA	6,8	1,3	4,2 – 9,3
Alb / Glob	0,85	0,07	0,70 – 1,00

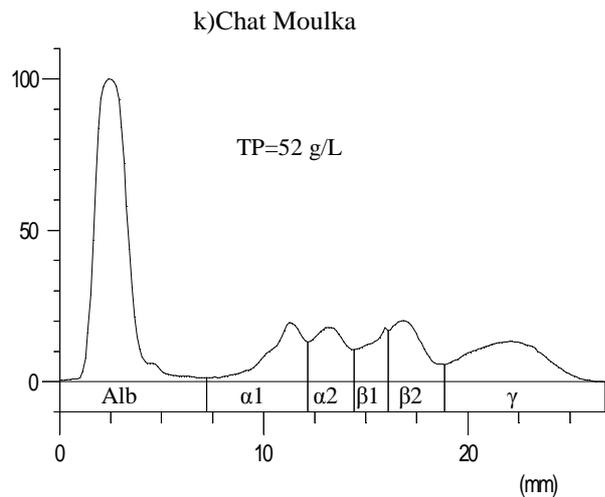
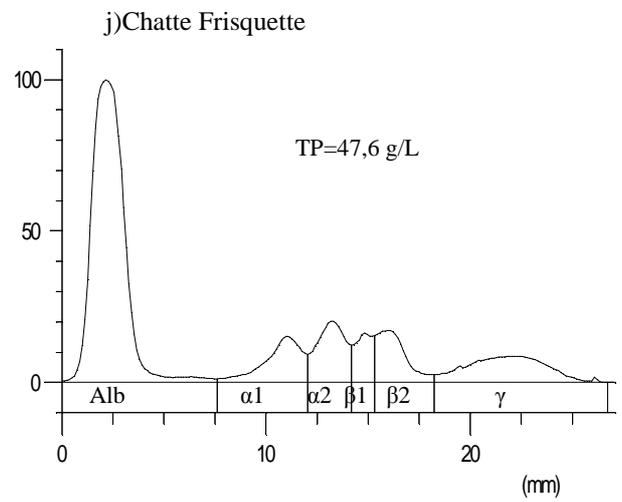
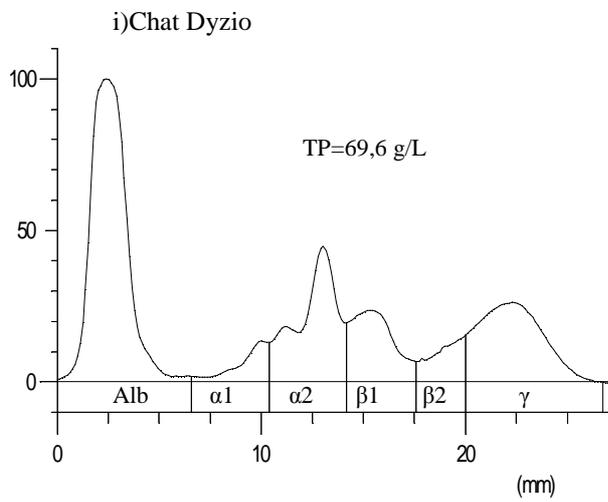
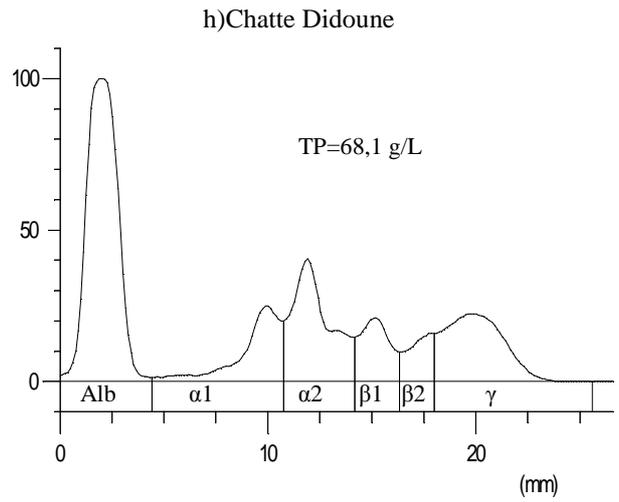
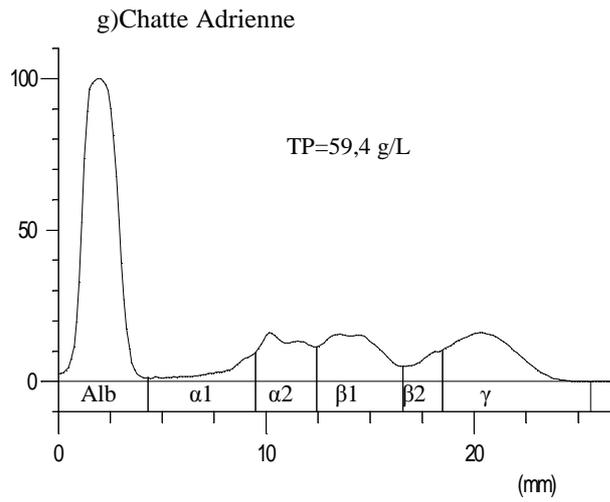
Ainsi nous avons pu décrire un profil-type de protéinogramme de chien présentant 6 fractions protéiques différentes avec des pics marqués pour les fractions α_2 - et β_2 -globulines et proposer des valeurs usuelles correspondantes.

2. Espèce féline

Nous avons utilisé le sérum de 11 chats de race commune présentés à l'école vétérinaire pour y subir une stérilisation de convenance. Les protéinogrammes correspondants, associés aux valeurs de protéines totales, sont présentés dans la figure 17.

Figure 17 : Protéinogrammes des chats.





On remarque quelques disparités entre les profils obtenus. Les profils des chats Picsou, Didoune, Dyzio, Frisquette, Moulka et Puce sont exclus de la suite de l'étude car ils présentent des anomalies (un pic marqué et étroit dans la fraction α_2 , valeur de protéines

totales trop basses ou trop hautes,...). Les pics en α_2 correspondent probablement au complexe haptoglobine-hémoglobine consécutif à l'hémolyse du prélèvement sanguin. On utilise finalement cinq chats (Knoppers, Diddols, Damoclès, Adrienne et Lina) pour décrire un profil type et définir des valeurs usuelles.

On peut affirmer que le protéinogramme du chat se compose de 6 fractions (albumine, α_1 -globulines, α_2 -globulines, β_1 -globulines, β_2 -globulines et γ -globulines) comme pour le chien. On peut signaler que les fractions albumine et α_1 -globulines sont plus espacées chez le chat que chez le chien et que la fraction β_2 -globulines est quasi-absente avec notre protocole.

Les concentrations calculées des fractions protéiques sont données dans le tableau 6 et les moyennes, écart-types et intervalles de confiance sont fournis par le tableau 7.

Tableau 6 : Résultats calculés des concentrations (g/L) des différentes fractions de protéines chez les chats.

CHAT	Knoppers	Diddols	Damoclès	Adrienne	Lina
PROT. TOT.	65,2	68,4	61,0	59,4	58,1
ALBUMINE	31,1	33,5	31,1	30,6	29,6
ALPHA 1	6,0	6,4	6,0	2,7	6,4
ALPHA 2	5,9	6,8	5,2	6,2	6,7
BETA 1	7,4	9,9	9,4	8,3	6,9
BETA 2	2,4	2,4	1,9	2,3	1,3
GAMMA	12,3	9,3	7,4	9,4	7,2
Alb / Glob	0,92	0,96	1,04	1,06	1,04

Tableau 7 : Moyenne, écart-type et intervalle de référence (g/L) chez le chat.

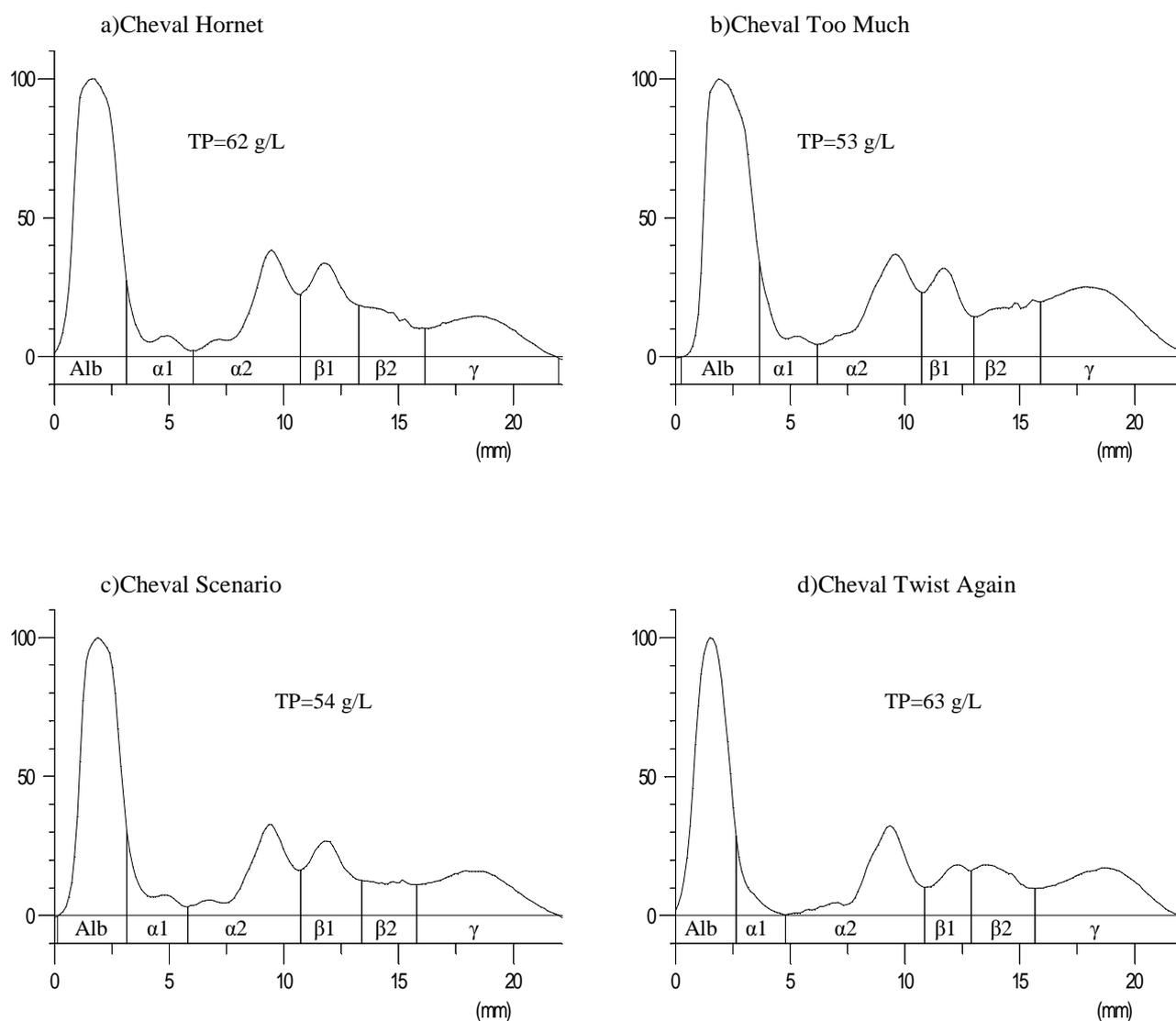
	MOYENNE	ECART-TYPE	INTERVALLE
PROT. TOT.	62,4	4,3	53,8 – 71,0
ALBUMINE	31,2	1,5	28,2 – 34,2
ALPHA 1	5,5	1,6	2,3 – 8,7
ALPHA 2	6,2	0,6	4,8 – 7,4
BETA 1	8,4	1,3	5,8 – 10,9
BETA 2	2,1	0,5	1,1 – 3,0
GAMMA	9,1	2,1	5,0 – 13,2
Alb / Glob	1,00	0,06	0,88 – 1,12

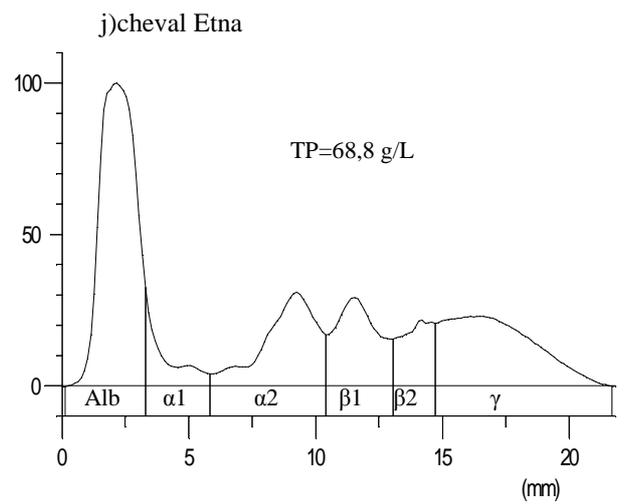
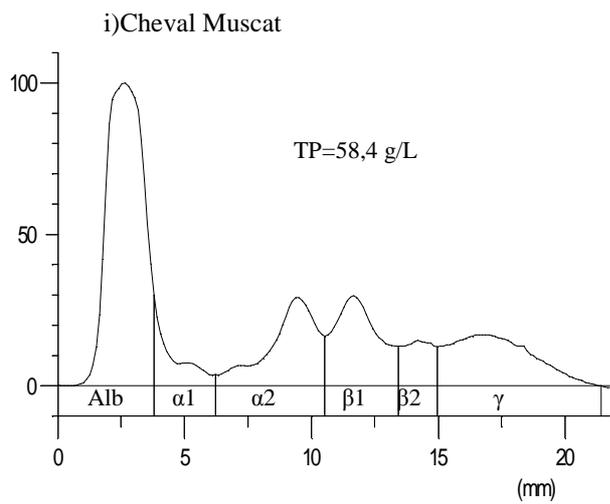
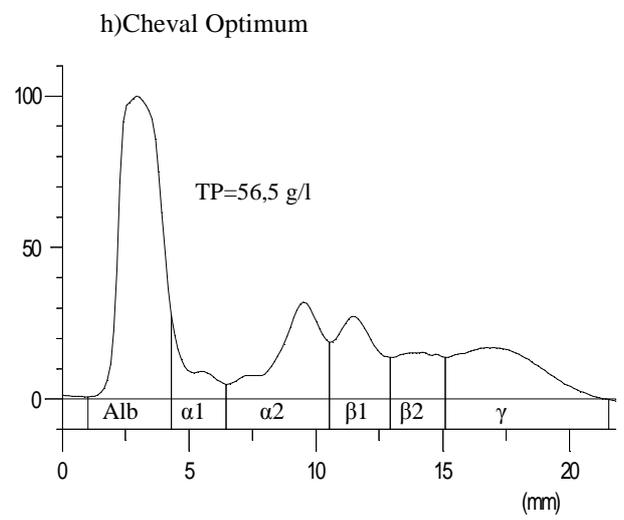
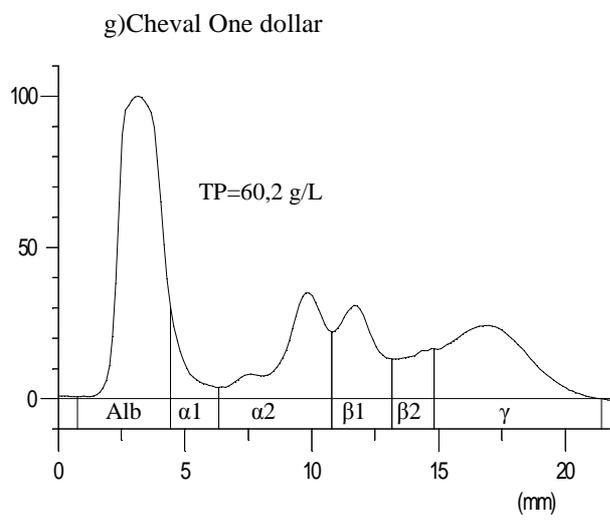
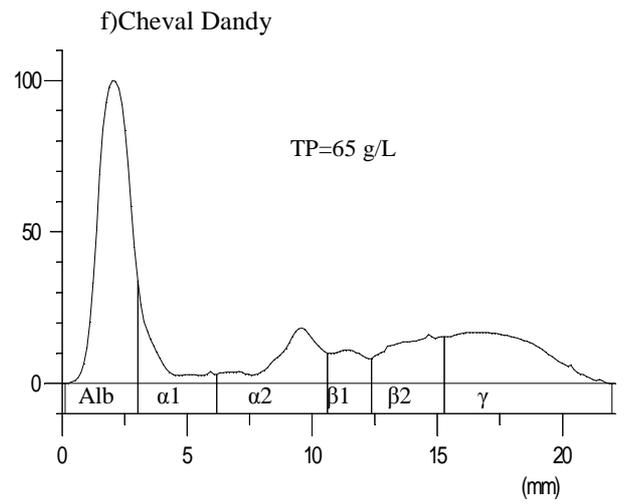
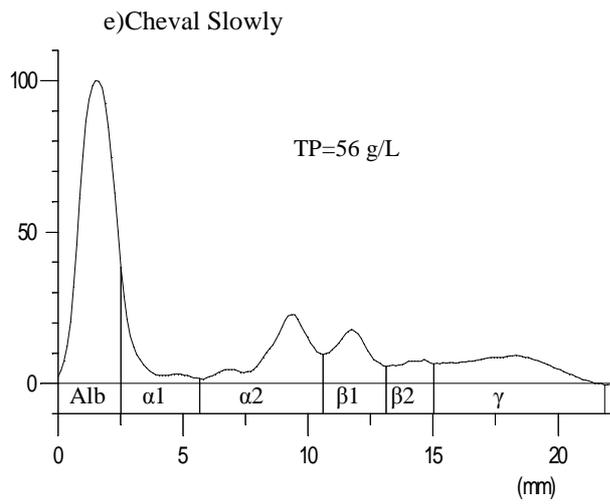
Donc nous avons pu décrire un profil type de protéinogramme de chat présentant 6 fractions protéiques différentes. On peut noter quelques différences par rapport au chien : les fractions albumine et α_1 -globulines sont plus espacées et la fraction β_2 -globuline est quasiment absente, fondue dans les γ -globulines. On a aussi pu proposer des valeurs usuelles de concentration des fractions protéiques majeures de cette espèce.

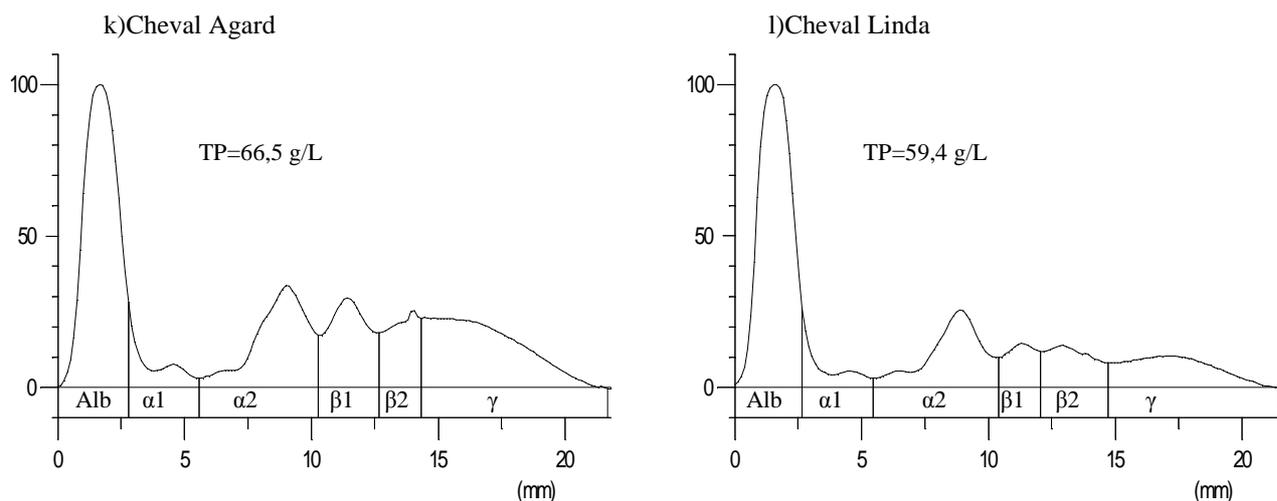
3. Espèce équine

Pour cette espèce, 12 sérums de chevaux Selles Français provenant d'un travail sur les valeurs biochimiques chez le cheval (CORNUS, 2010) ont été retenus. Les protéinogrammes correspondants, associés à leur valeur de protéines totales, sont présentés dans la figure 18.

Figure 18 : Protéinogrammes des chevaux.







Nous avons retenu les chevaux suivants : Hornet, Too Much, Scenario, One Dollar, Optimum, Muscat, Etna et Agard. Les profils obtenus avec ces chevaux sont semblables et leurs résultats nous ont servis pour définir les caractéristiques du protéinogramme-type du cheval et proposer des valeurs usuelles. Les autres chevaux ont été exclus de la suite de l'étude.

Le protéinogramme du cheval se compose de 6 fractions (albumine, α 1-globulines, α 2-globulines, β 1-globulines, β 2-globulines, γ -globulines). L'extrémité distale du bloc α 1-globulines migre jusqu'au niveau de l'extrémité proximale du pic d'albumine. Ces deux parties se superposent en partie sur les courbes électrophorétiques. On remarque également que le pic β 2-globulines est peu marqué.

Les concentrations calculées des fractions protéiques sont données dans le tableau 8 et les moyennes, écart-types et intervalles de confiance sont fournis par le tableau 9.

Tableau 8 : Résultats calculés des concentrations (g/L) des différentes fractions de protéines chez les chevaux.

CHEVAL	Hornet	Too Much	Scenario	One Dollar	Optimum	Muscat	Etna	Agard
PROT. TOT.	62,0	53,0	54,0	60,2	56,5	58,4	68,8	66,5
ALBUMINE	24,2	22,8	22,9	25,1	24,6	25,0	25,7	23,4
ALPHA 1	3,1	2,5	3,0	2,6	2,9	3,2	3,6	3,2
ALPHA 2	10,2	9,1	9,2	9,6	8,8	8,8	10,9	11,5
BETA 1	6,4	7,5	6,8	7,5	6,7	8,7	8,7	8,2
BETA 2	5,9	4,8	3,6	3,3	4,2	3,0	4,7	5,2
GAMMA	12,3	6,4	8,5	12,3	9,1	9,6	15,1	14,9
Alb / Glob	0,64	0,75	0,74	0,71	0,77	0,75	0,60	0,54

Tableau 9 : Moyenne, écart-type et intervalle de référence (g/L) chez le cheval.

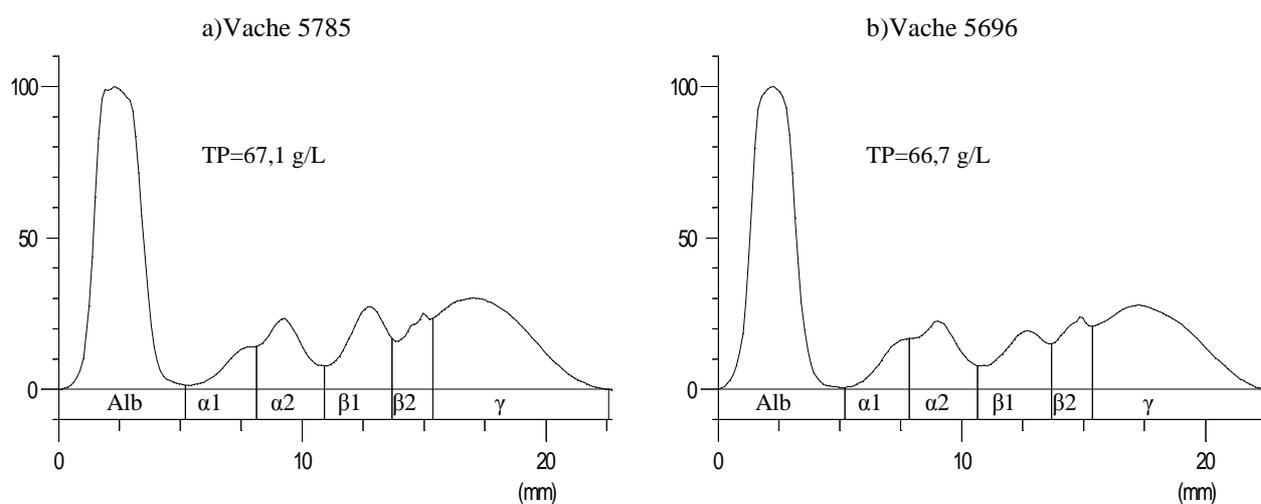
	MOYENNE	ECART-TYPE	INTERVALLE
PROT. TOT.	59,9	5,6	48,6 – 71,3
ALBUMINE	24,2	1,1	22,0 – 26,4
ALPHA 1	3,0	0,4	2,2 – 3,8
ALPHA 2	9,8	1,0	7,7 – 11,8
BETA 1	7,6	0,9	5,7 – 9,4
BETA 2	4,3	1,0	2,3 – 6,4
GAMMA	11,0	3,1	4,7 – 17,4
Alb / Glob	0,69	0,08	0,50 – 0,90

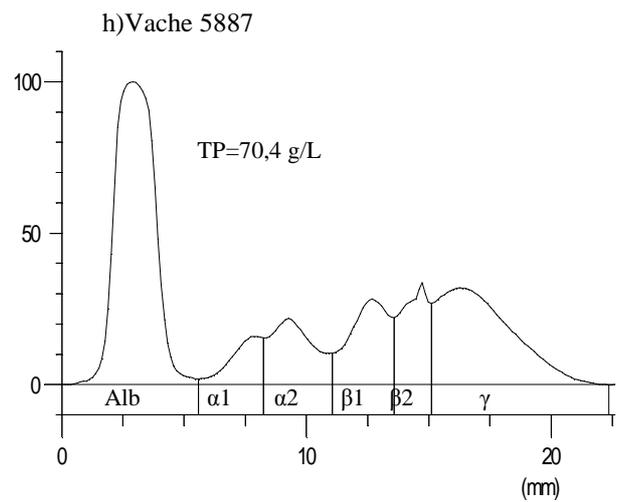
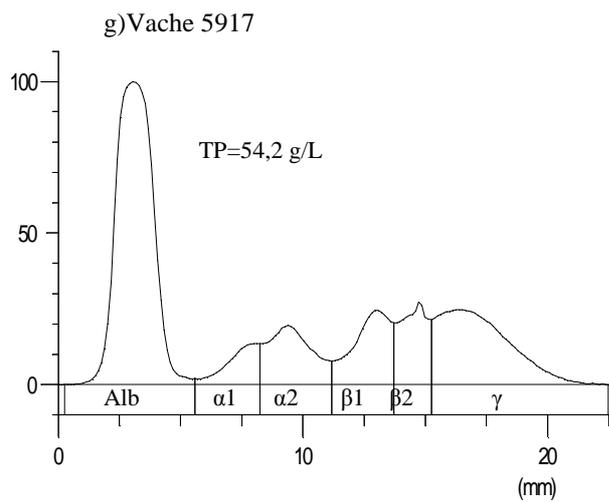
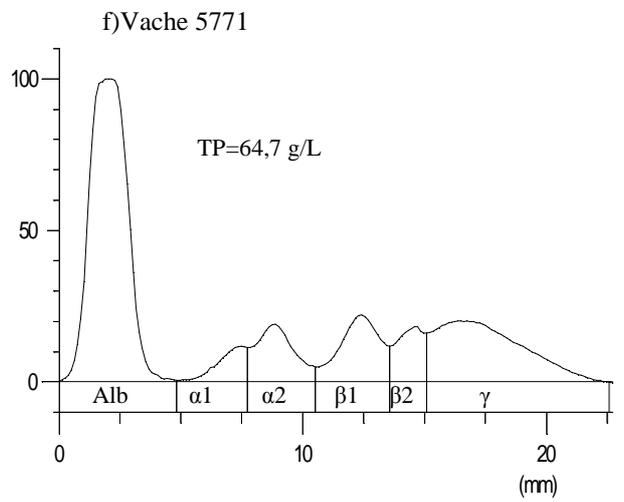
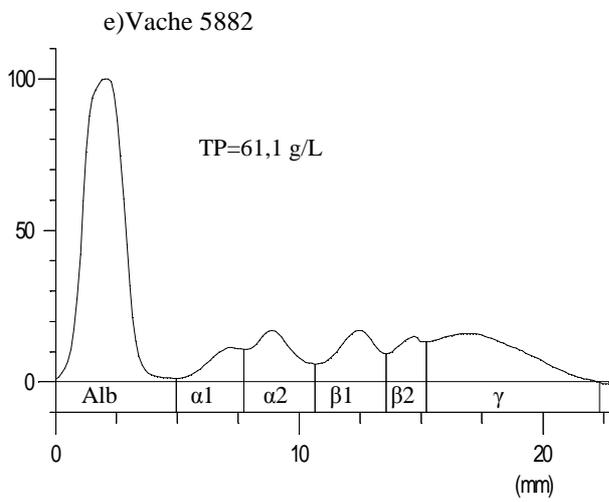
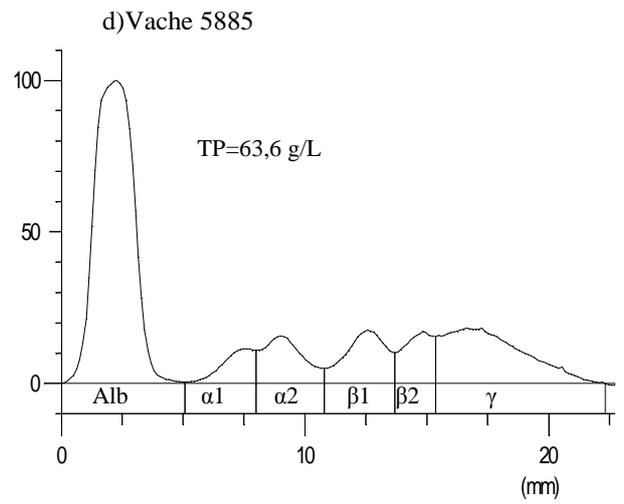
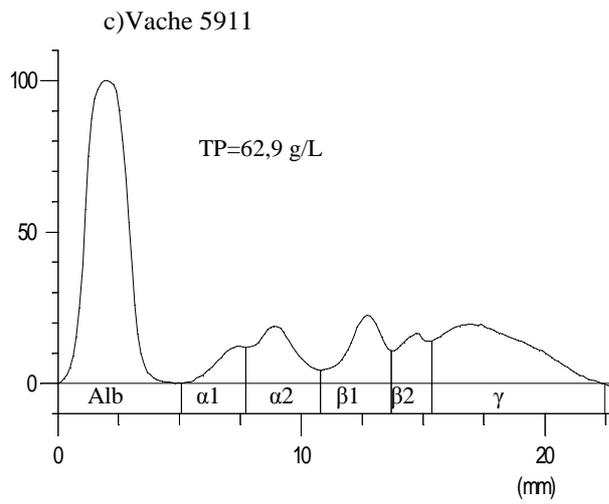
Nous avons donc pu décrire un protéinogramme type caractérisé par 6 fractions et la superposition partielle de l'albumine et du pic d' α 1-globulines. Nous avons aussi pu proposer des valeurs usuelles pour les fractions protéiques majeures de cette espèce.

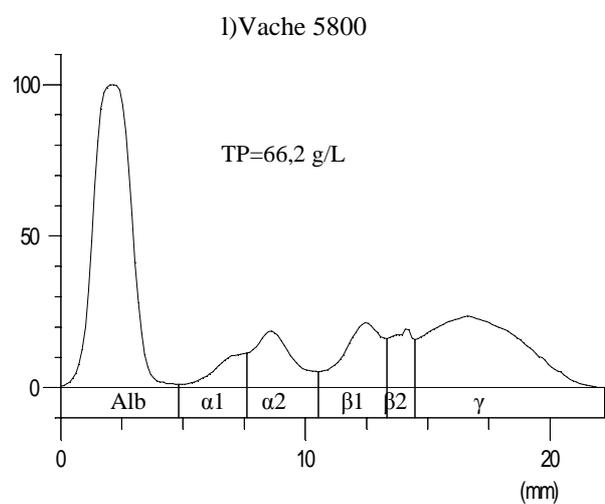
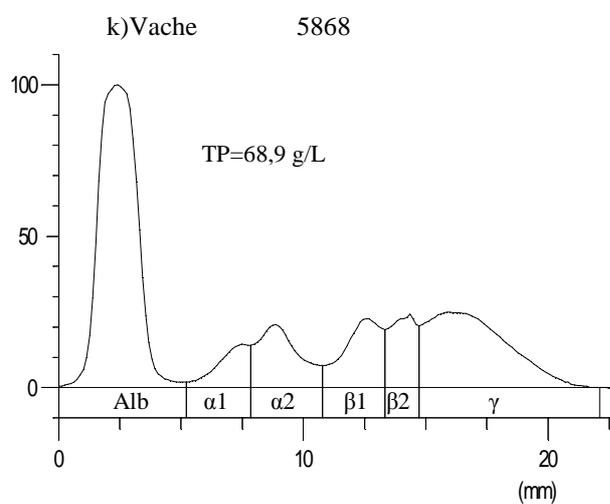
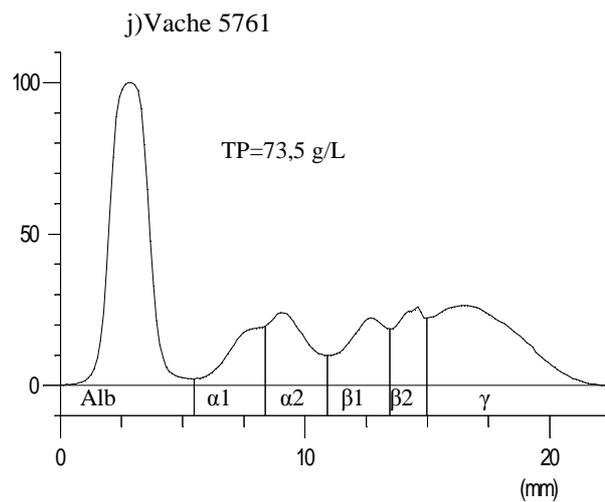
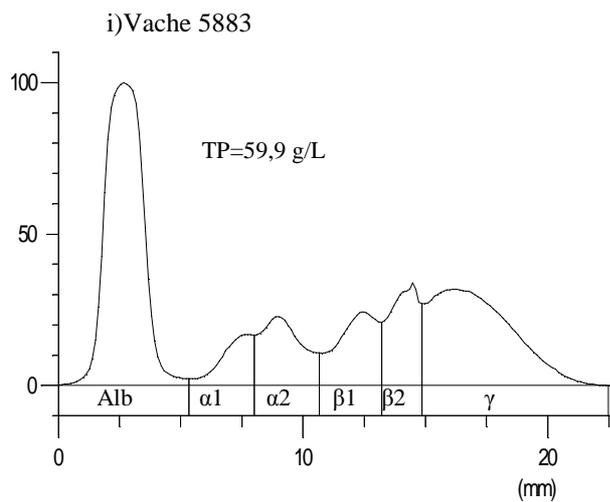
4. Espèce bovine

Pour cette espèce, 12 sérums de vaches Prim'Holstein ont été analysés. Les protéinogrammes correspondants, associés à la valeur de protéines totales, sont présentés dans la figure 19.

Figure 19 : Protéinogrammes des vaches.







Tous les profils obtenus sont similaires et nous avons pu décrire un profil type du protéinogramme du bovin. Celui-ci se compose également de 6 fractions (albumine, $\alpha 1$ -globulines, $\alpha 2$ -globulines, $\beta 1$ -globulines, $\beta 2$ -globulines, γ -globulines). Une zone creuse est nettement visible entre les pics $\alpha 2$ et $\beta 1$.

Les concentrations calculées des fractions protéiques sont données dans le tableau 10 et les moyennes, écart-types et intervalles de confiance sont fournis par le tableau 11.

Tableau 10 : Résultats calculés des concentrations (g/L) des différentes fractions de protéines chez les vaches.

VACHE	5785	5696	5911	5885	5882	5771
PROT. TOT.	67,1	66,7	62,9	63,6	61,1	64,7
ALBUMINE	29,2	28,6	32,5	30,9	31,4	30,9
ALPHA 1	2,9	3,2	3,0	2,7	3,2	2,7
ALPHA 2	6,1	6,6	5,2	6,1	5,7	5,8
BETA 1	7,0	6,1	5,9	6,2	5,7	7,1
BETA 2	4,6	4,8	4,1	3,8	3,5	4,0
GAMMA	17,3	17,5	12,2	13,9	11,6	14,3
Alb / Glob	0,77	0,75	1,07	0,94	1,06	0,91

VACHE	5917	5887	5883	5761	5868	5800
PROT. TOT.	57,2	70,4	59,9	73,5	68,9	66,2
ALBUMINE	25,5	28,9	24,2	28,5	30,7	29,7
ALPHA 1	2,8	3,5	4,4	3,9	3,6	2,8
ALPHA 2	5,8	6,7	6,1	7,0	6,7	5,8
BETA 1	6,0	7,9	5,8	7,2	6,6	6,5
BETA 2	4,9	6,2	4,7	7,1	5,0	3,3
GAMMA	12,2	17,1	14,7	19,7	16,2	18,0
Alb / Glob	0,80	0,70	0,68	0,63	0,80	0,82

Tableau 11 : Moyenne, écart-type et intervalle de référence (g/L) chez la vache.

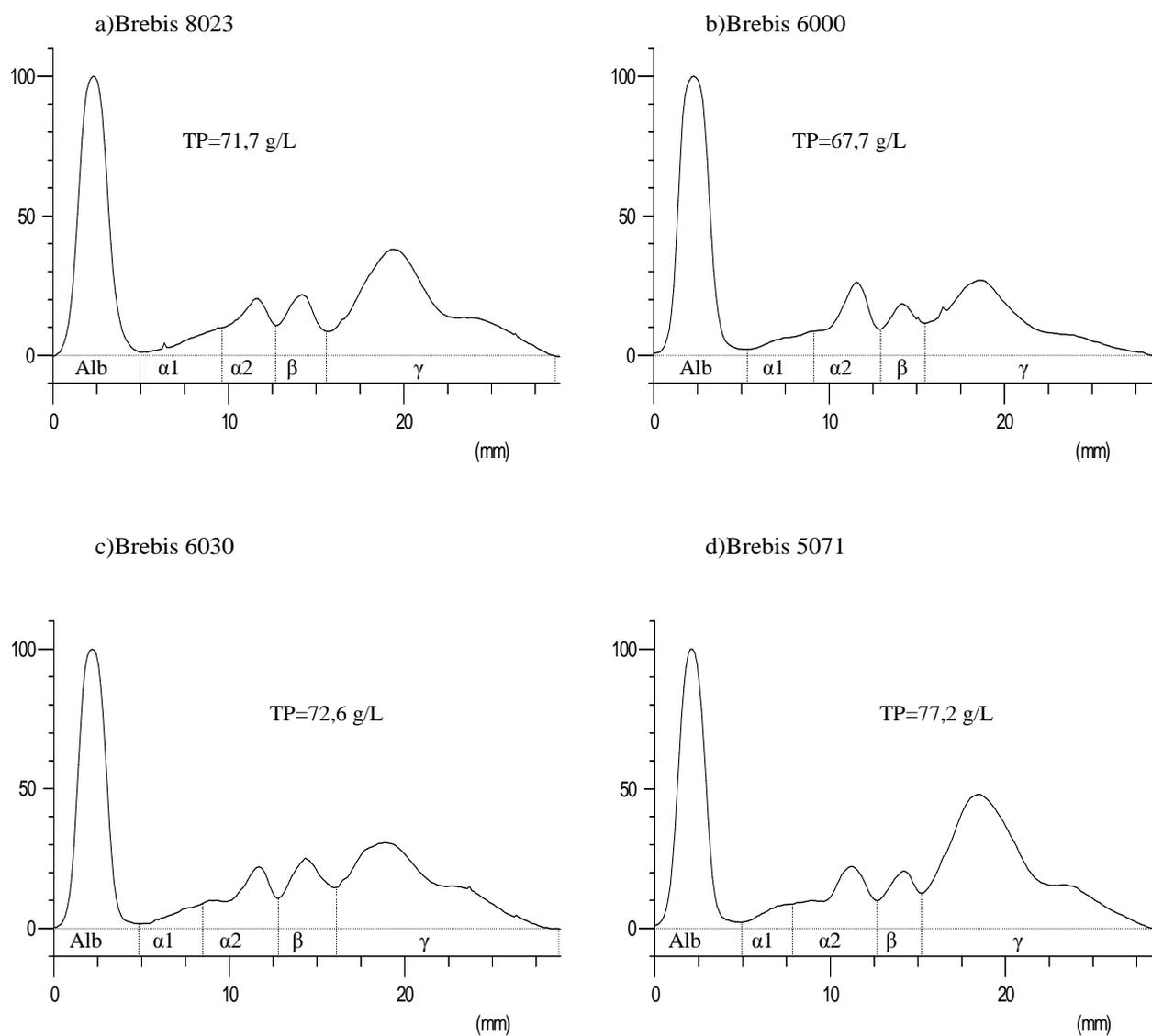
	MOYENNE	ECART-TYPE	INTERVALLE
PROT. TOT.	65,2	4,6	55,9 – 74,4
ALBUMINE	29,3	2,4	24,4 – 34,1
ALPHA 1	3,2	0,5	2,1 – 4,3
ALPHA 2	6,1	0,5	5,0 – 7,3
BETA 1	6,5	0,7	5,1 – 7,9
BETA 2	4,7	1,1	2,4 – 6,9
GAMMA	15,4	2,6	10,1 – 20,7
Alb / Glob	0,83	0,14	0,50 – 1,10

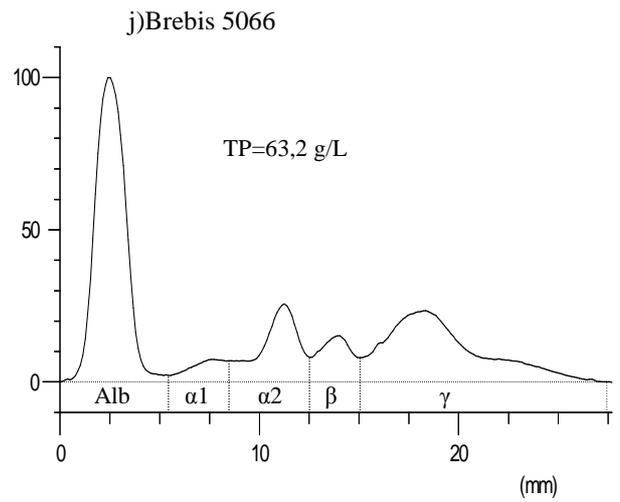
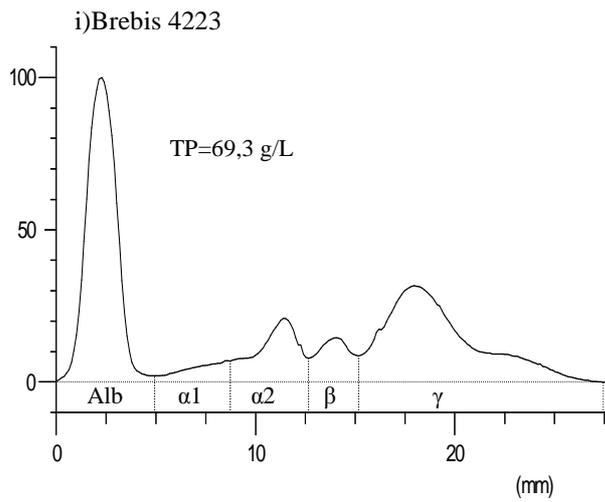
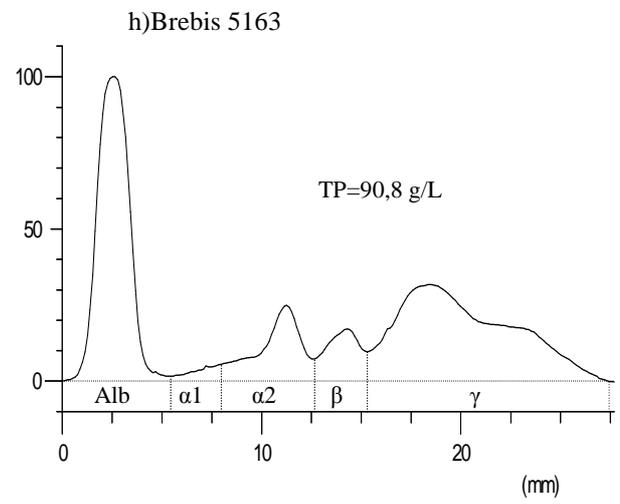
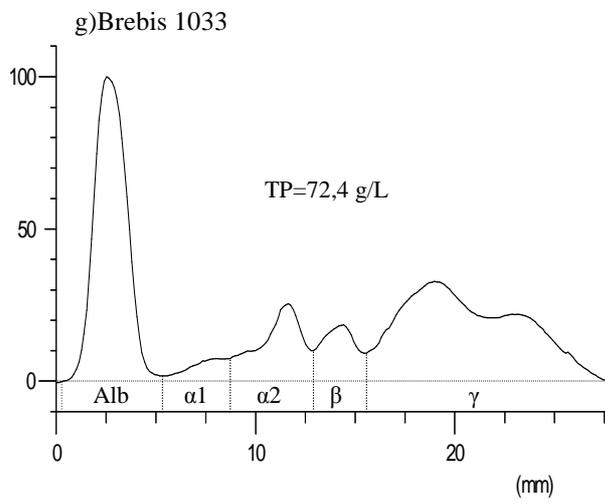
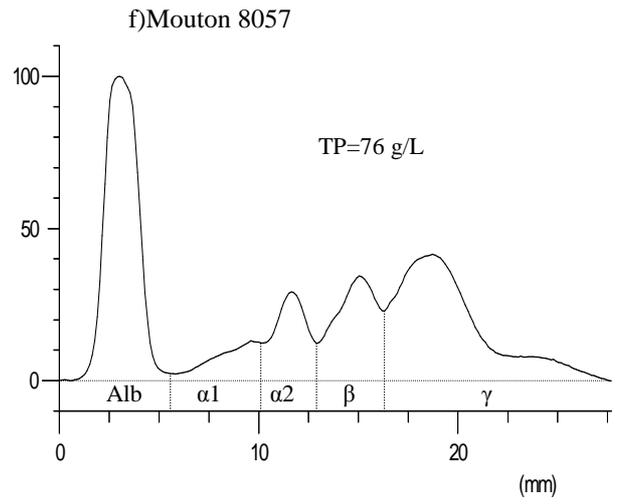
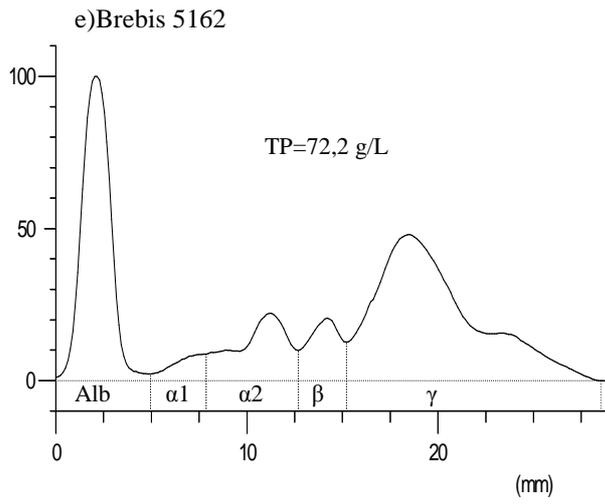
Nous avons donc pu décrire un protéinogramme type caractérisé par 6 fractions et la présence d'une zone creuse entre les fractions α_2 et β_1 . Nous avons aussi pu proposer des valeurs usuelles des fractions protéiques majeures de cette espèce.

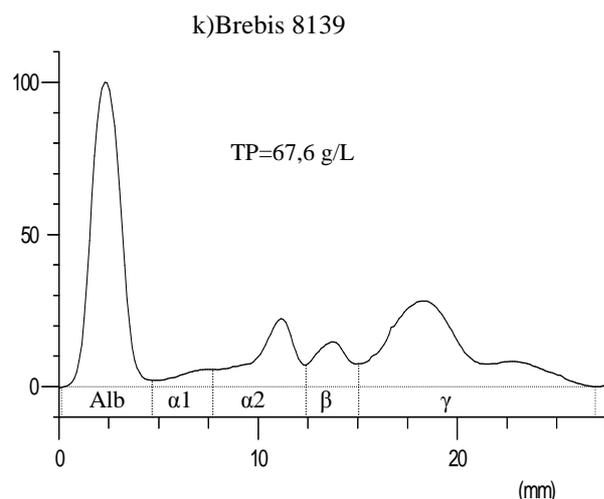
5. Espèce ovine

Pour cette espèce, 11 sérums de moutons ont été analysés. Les protéinogrammes correspondants, associés à la valeur de protéines totales, sont présentés dans la figure 20.

Figure 20 : Protéinogrammes des moutons.







Nous avons décidé d'exclure la brebis 5163 de la suite de l'étude pour cause d'hyperprotéinémie. Toutes les autres électrophorèses présentent un profil similaire caractéristique.

Le protéinogramme se compose de 5 fractions (albumine, α 1-globulines, α 2-globulines, β -globulines, γ -globulines). La fraction β ne se divise pas en deux sous-fractions comme nous l'avons observée dans les autres espèces. La fraction γ pourrait être subdivisée en deux fractions γ 1 et γ 2. Cela ne présentant pas d'intérêts cliniques, nous avons décidé de ne pas la fractionner.

Les concentrations calculées des fractions protéiques sont données dans le tableau 12 et les moyennes, écart-types et intervalles de confiance sont fournis par le tableau 13.

Tableau 12 : Résultats calculés des concentrations (g/L) des différentes fractions de protéines chez les moutons.

MOUTON	8023	6000	6030	5071	5162	8057	1033	4223	5066	8139
PROT. TOT.	71,7	67,7	72,6	77,2	72,2	76,0	72,4	69,3	63,2	67,6
ALBUMINE	26,1	28,8	25,5	23,5	29,2	26,6	26,0	28,6	28,1	28,6
ALPHA 1	3,2	3,1	2,9	2,3	3,1	3,6	2,3	2,7	2,6	2,0
ALPHA 2	6,1	8,6	8,1	8,8	8,2	8,3	8,2	7,9	8,6	8,7
BETA	6,2	5,3	8,5	5,4	4,8	11,3	5,1	4,6	4,5	4,7
GAMMA	30,1	21,9	27,6	37,1	26,9	26,1	30,7	25,4	19,5	23,6
Alb / Glob	0,57	0,74	0,54	0,44	0,68	0,54	0,56	0,70	0,80	0,73

Tableau 13 : Moyenne, écart-type et intervalle de référence (g/L) chez le mouton.

	MOYENNE	ECART-TYPE	INTERVALLE
PROT. TOT.	71,0	4,2	62,6 – 79,4
ALBUMINE	27,1	1,8	23,4 – 30,8
ALPHA 1	2,8	0,5	1,8 – 3,8
ALPHA 2	8,2	0,8	6,6 – 9,7
BETA	6,0	2,2	1,6 – 10,5
GAMMA	26,9	5,0	16,9 – 36,9
Alb / Glob	0,63	0,12	0,40 – 0,90

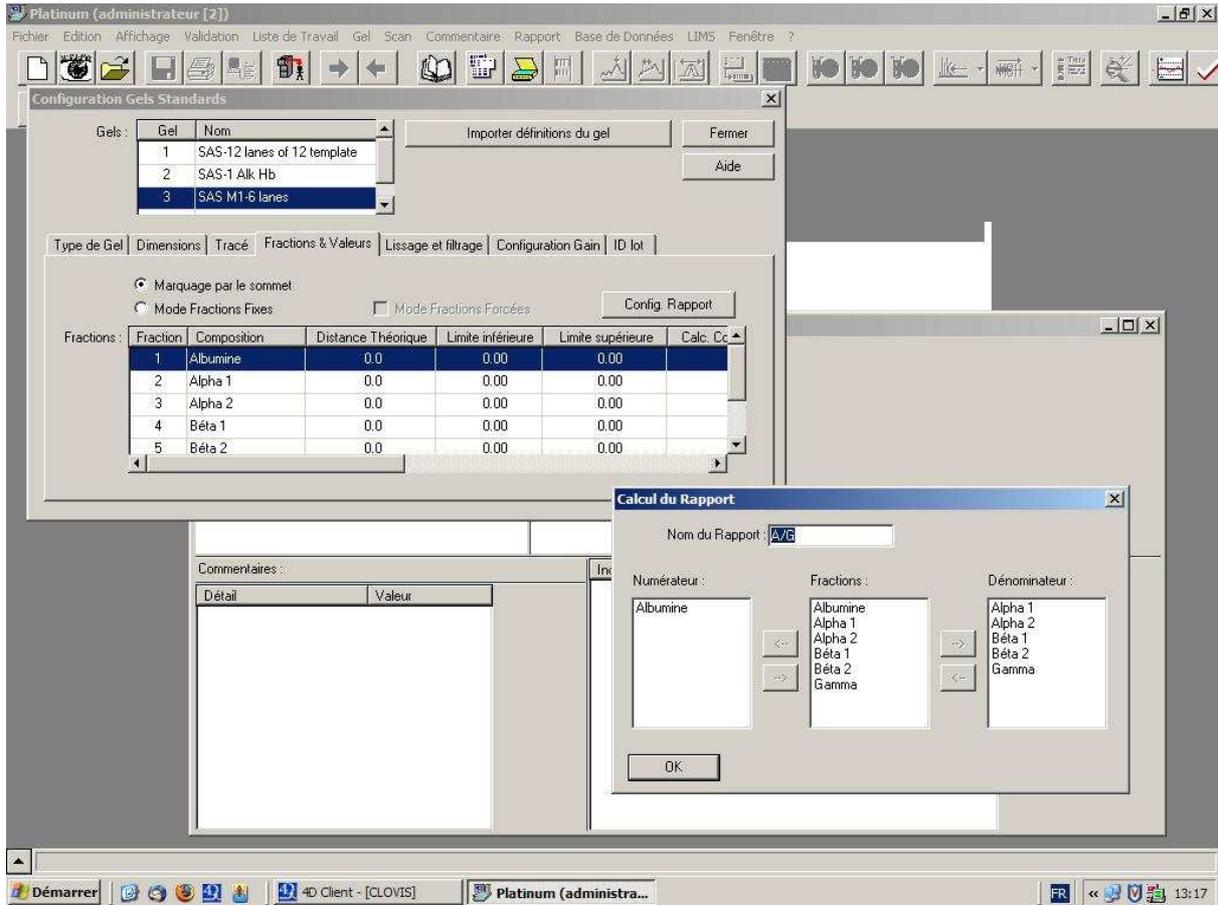
Nous avons donc pu décrire un protéinogramme-type caractérisé par 5 fractions. La fraction β est présente mais n'est pas subdivisée en deux sous-fractions. En revanche la fraction γ , prépondérante, pourrait être subdivisée en deux sous-fractions γ_1 et γ_2 . Nous avons aussi pu proposer des valeurs usuelles des fractions protéiques majeures de cette espèce.

C. Paramétrage du logiciel

Après avoir calculé les intervalles de référence pour chaque espèce, il a fallu paramétrer le logiciel Platinum 3®. Ce paramétrage a pour but de faciliter le travail de l'opérateur en appliquant directement les valeurs usuelles aux analyses demandées. De plus, il a fallu aussi établir un document pour transmettre les résultats aux cliniciens concernés.

Pour cela, on utilise le mode administrateur du logiciel. On sélectionne le menu « Gel » dans la barre des menus puis le sous menu « Configuration ». On obtient un écran similaire à la figure 21.

Figure 21 : Capture d'écran de la configuration des gels.



Sur la figure 21, le menu « configuration des gels » est ouvert dans le coin supérieur gauche. La configuration passe par la création des différentes fractions : ici Albumine, Alpha1, Alpha2, Béta1 et Béta2 sont visibles. On entre les valeurs usuelles, que l'on souhaite utiliser, pour chaque fraction dans les colonnes adjacentes. On a ainsi créé un profil électrophorétique avec des fractions normées.

Ensuite on accède à la fenêtre « Calcul du Rapport », visible dans le coin inférieur droit sur la figure 21, en cliquant sur « Config. Rapport ». Ceci permet de paramétrer le rapport Albumine/Globuline que le programme calculera ainsi automatiquement.

Pour établir un modèle de rapport, on sélectionne le menu « Rapport » de la barre des menus puis le sous-menu « Editer un Rapport ». On ouvre ainsi un éditeur qui permet de configurer un rapport en ajoutant soit un bloc d'information (identité patient complète, résultats chiffrés par exemple...) soit une information unique (date de naissance, date de l'analyse par exemple...). Le rapport est la feuille de résultats transmise aux cliniciens.

La figure 22 propose un rapport pour une utilisation en pratique courante. Il regroupe les principales informations telles l'identification de l'animal et du propriétaire, le tracé électrophorétique, les résultats calculés et des éventuels commentaires.

Figure 22 : Rapport proposé pour la transmission des résultats aux cliniciens.

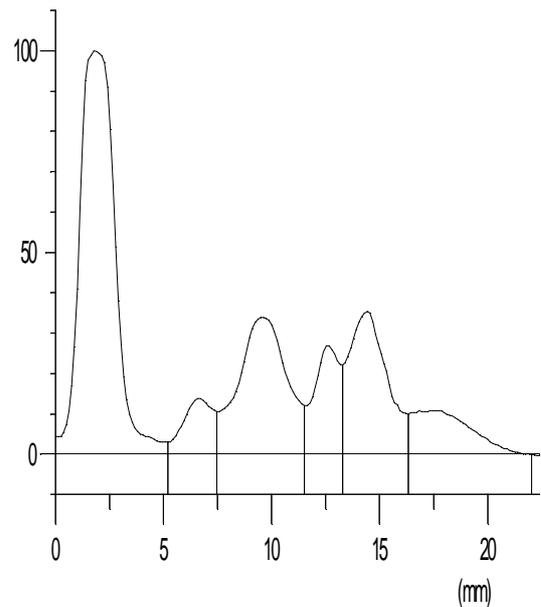


Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
 7 avenue du Général de Gaulle
 94704 Maisons Alfort Cedex
 Laboratoire d'Analyses Biochimiques

**ELECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES
 RESULTAT DU 04/09/2009 12 :18/07**

Dossier	Luciole	Propriétaire	ENVA
Animal	Luciole CN F Né(e) le 27/04/07		

Index	Fraction	% Relatif	Conc. (g/L)	Normales (g/L)
1	Albumine	42,82%	29,68	27,8 – 37,5
2	Alpha 1	4,99%	3,46	2,4 – 4,3
3	Alpha 2	19,90%	13,79	8,8 – 16,3
4	Béta 1	8,29%	5,75	2,5 – 6,3
5	Béta 2	16,17%	11,21	10,7 – 11,7
6	Gamma	7,83%	5,42	4,2 – 9,3
Total			69,30	
Rapport A/G		0,75		



Commentaires :

Le Responsable