



Techniques électrophorétiques

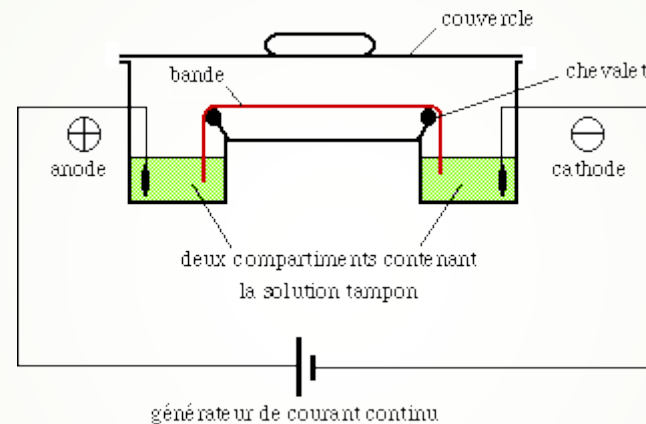


Plan

- Définition
- L'électrophorèse des protéines sériques
 - Electrophorèse sur gel
 - Électrophorèse capillaire
- Les autres électrophorèses
 - En capillaire
 - Classiques sur gel
 - La place des anticorps
 - Isofocalisation
 - Autres électrophorèses
- Conclusion

Définition

- Technique de séparation de particules chargées sous l'action d'un champ électrique



- La migration va dépendre de plusieurs facteurs:
 - La mobilité électrophorétique fonction de la charge et de la géométrie de la particule
 - Les forces de frottement liées à la viscosité du milieu et qui s'opposent au déplacement.
- Révélation adaptée à ce que l'on recherche (colorant spécifique, Ac...)

Quelle électrophorèse?

- Séparation en fonction de la charge:
 - La plus classique,
 - Gel à mailles lâches pour que la taille n'influence pas la migration.
 - Choix du tampon en fonction de la charge que l'on veut attribuer aux protéines (charge + si $\text{pH} < \text{pHi}$)
 - Isofocalisation avec gradient de pH pour sensibiliser l'électrophorèse
- Séparation en fonction de la taille:
 - Prétraitement des protéines au SDS pour qu'elles soient toutes chargées de manière identique
 - Gel à mailles plus fines ou gradient de concentration pour ralentir les protéines les plus grosses
- Association des 2 techniques:
 - Électrophorèse bidimensionnelle

Remarques générales

- Vérifier le bon fonctionnement du générateur
 - Présence de bulles dans le tampon
- Eviter les bulles
 - Dans le gel
 - Lors du dépôt de l'échantillon
- Eviter les contamination
 - Adapter la quantité déposée à la taille du puits
- Possible effet de bord
 - Ne pas mettre les échantillon les plus précieux dans les premiers et derniers puits.



L'électrophorèse des protéines sériques

L'électrophorèse des protéines

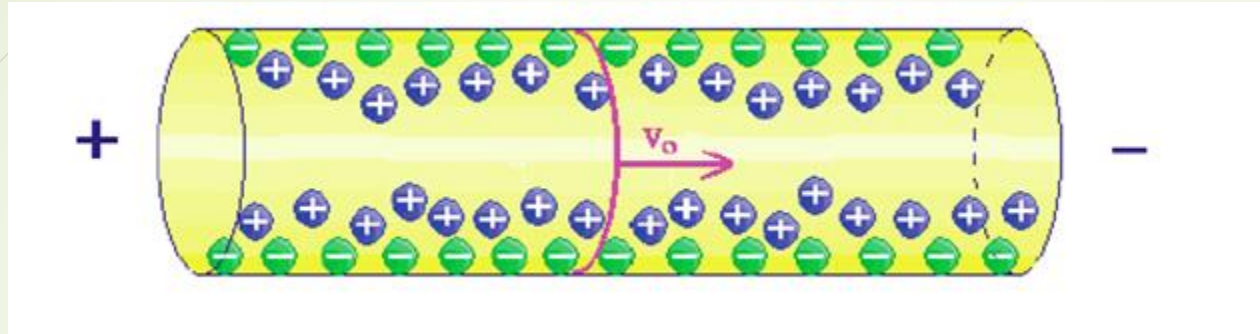
- Technique d'analyse globale des protéines de l'organisme.
 - Aspect qualitatif et semi-quantitatif
 - Répartition relative de ces protéines: notion de profil (inflammation, dénutrition, syndrome néphrotique...)
 - Détection d'anomalies quantitative: déficit immunitaire, déficit en AAT
 - Détection d'anomalies qualitatives: présence d'une protéine anormale (myélome, MGUS...)
- 2 techniques disponibles:
 - Électrophorèse sur gel
 - Électrophorèse capillaire

Électrophorèse sur gel

- En général gel de polyacrylamide mais possible sur agarose ou acétate de cellulose: mailles lâches pour permettre le passage de toutes les protéines, la migration se fait en fonction de la charge.
- En fonction du tampon:
 - Toutes les protéines sont chargées négativement et migrent vers l'anode
 - Les gammaglobulines migrent vers la cathode, point de dépôt visible à la jonction gammaglobulines/bétaglobulines (possibilité de bande visible au point de dépôt en cas d'IgM polymérisées ou de cryoglobulines).
- Utilisation d'un colorant spécifique des protéines tel que le Rouge Ponceau ou l'Amido-Schwartz

L'électrophorèse capillaire

Electrophorèse capillaire



Flux d'électro-endosmose

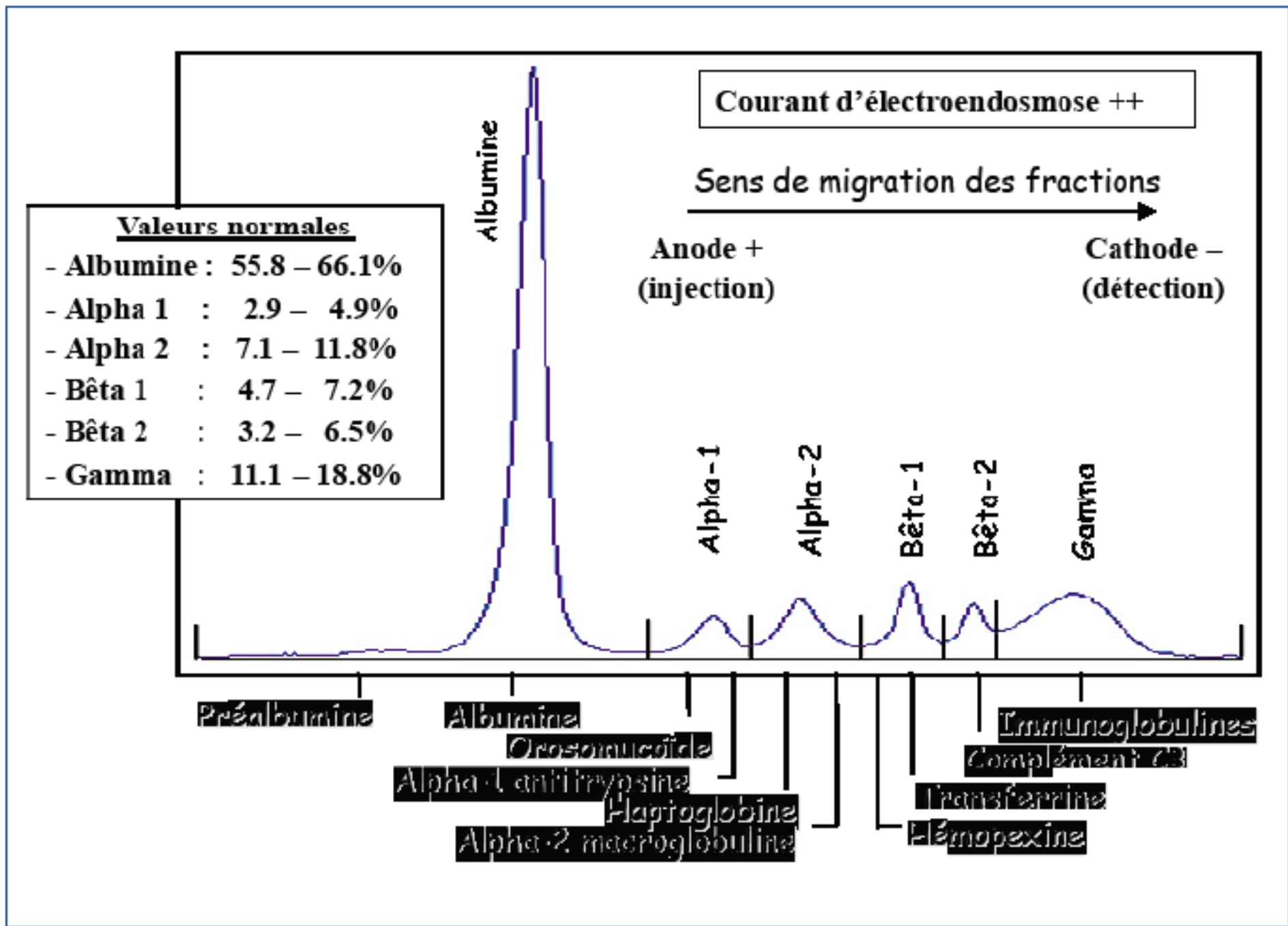
Capillaire de silice tapissé de groupements silanols, chargés négativement si $\text{pH} > 2 \Rightarrow$ couche fixe d'ions négatifs.

Les ions positifs du solvant viennent se fixer et forment une couche mobile sous l'action du champ électrique. Ce flux puissant d'endosmose entraîne les protéines vers la cathode.

Ils vont accélérer ou ralentir la migration en fonction de la charge des protéines.

Les gammaglobulines sortent en premier et l'albumine en dernier

Lecture par spectrophotométrie.



A red arrow pointing to the right, located at the top left of the slide.

L'électrophorèse des protéines

- Les différentes fractions
 - Préalbumine: non quantifiée mais peut être visible en avant de l'albumine
 - Albumine: pic majoritaire, utilisé comme référence
 - Alpha1: orosomucoïde et alpha1 antitrypsine (AAT)
 - Alpha2: haptoglobine, céruléoplasmine, alpha2macroglobuline
 - Béta1: transferrine, hémoglobine libre
 - Béta2: complément, CRP, fibrine
 - Gamma: immunoglobulines

Différences gel/capillaire

- ▶ Les 2 techniques sont très bien corrélées
 - ▶ Plus grande sensibilité de l'électrophorèse capillaire
 - ▶ Fréquence accrue des bisalbuminémies
 - ▶ Pertes de la répartition gaussienne des gammaglobulines plus fréquentes
 - ▶ Épaulements de l'albumine en capillaire dus à la présence
 - ▶ De sels biliaires (non vus sur gel)
 - ▶ De lipoprotéines (les lipoprotéines pénètrent mal dans le gel et forment des arcs en alpha 2)
- ▶ Augmentation de la fraction alpha1 en capillaire car l'orosomucoïde (protéine acide) ne prend pas le colorant en gel
- ▶ Les pics monoclonaux ne migrent pas forcément au même endroit selon la technique.

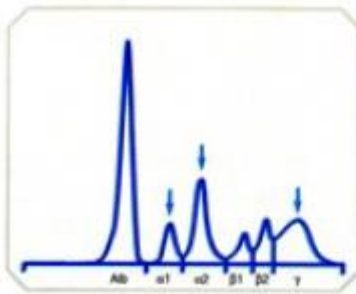
L'interprétation de l'EPP

- Vision globale de la répartition des protéines sériques
- Interprétation absolue (en g/l) et relative (en %)
- Notion de profils
 - Inflammatoire: augmentation des fractions alpha1 et/ou alpha2 fréquemment associée à une hypoalbuminémie. Au niveau des gammaglobulines la réaction inflammatoire peut se traduire par une élévation poly ou oligoclonale, ou par une hypogammaglobulinémie.
 - Syndrome néphrotique: diminution importante de l'albumine avec augmentation majeure de la fraction alpha2. Rechercher une protéinurie. Le profil des autres fractions dépendra de la pureté du SN et du degré d'atteinte rénale.
 - Cirrhose: Hypoalbuminémie avec hypergammaglobulinémie et bloc bêta-gamma.

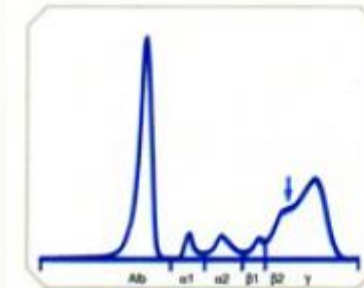
Tableau 3. Cas pathologiques

	Albumine	$\alpha 1$	$\alpha 2$	β	γ
Profil inflammatoire - aigu - chronique (maladies infectieuses, néoplasiques, allergiques)	N ou \	/	N ou ↗	N N ou \	N
Cirrhose	\	N ou \	N ou \	Soudure N ou ↗	
Hypoprotidémie - profil exsudatif - malnutrition	\	N ou /	N ou / N ou /	N ou \	N ou \
Syndrome néphrotique	\	N ou \	/	N ou /	\
Hypergammaglobulinémie	\	N	N	N	/
Dysglobulinémies monoclonales	\	N	Présence d'un pic (en zone $\alpha 2$, β ou γ avec les immunoglobulines polyclonales normales ou diminuées)		

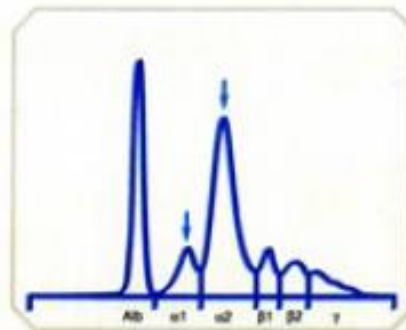
N = normal; / ou \ = augmentation ou diminution relative.



Maladie inflammatoire chronique



Bloc bêta-gamma : Profil cirrhotique



Syndrome néphrotique

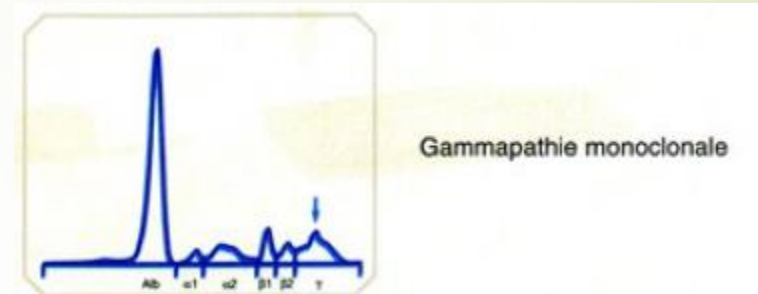
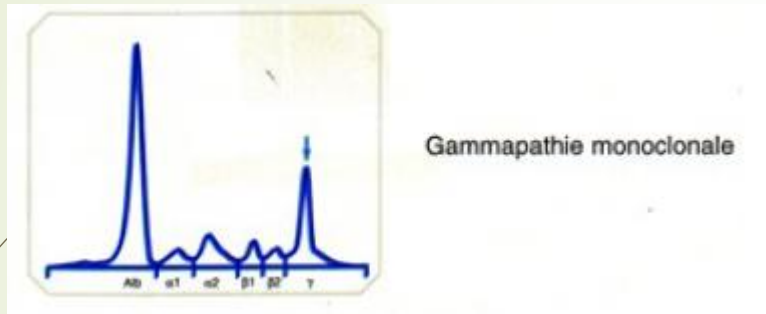
Anomalies quantitatives détectables

- Hypoalbuminémie
- Déficit en alpha1 antitrypsine
- Déficit haptoglobine en cas d'hémolyse intravasculaire
- Élévation de la transferrine dans les carences martiales
- Hypo ou hypergammaglobulinémies

Gammapathies

- ▶ Hypogammaglobulinémie
 - ▶ Déficit immunitaire (souvent acquis)
 - ▶ Myélome à chaînes légères
- ▶ Hypergammaglobulinémie
 - ▶ Syndrome infectieux ou inflammatoire
 - ▶ Attention aux perfusions d'immunoglobulines (profil trop joli)
- ▶ Anomalie de la répartition des gammaglobulines
 - ▶ Bloc bêta-gamma: excès d'IgA
 - ▶ Zone de condensation
 - ▶ Profil oligiclonal
 - ▶ Restriction d'hétérogénéité

Gammaglobulines



Gammapathies monoclonales

- ▶ Découverte d'une gammapathie monoclonale
 - ▶ Malignes: myélomes, Waldenström, maladie des chaînes lourdes...
 - ▶ MGUS: pas de répression des autres immunoglobulines
 - ▶ Hypogammaglobulinémies sévères: attention au myélome à chaînes légères
- ▶ Quantification du pic sur l'électrophorèse
 - ▶ Le dosage pondéral des immunoglobulines n'est pas performant en cas d'immunoglobuline monoclonale
 - ▶ Plus difficile en beta globulines
- ▶ Typage obligatoire par immunofixation ou immunosoustraction

Gammapathies monoclonales

- ▶ Suivi sur électrophorèse avec quantification des pics
 - ▶ Toujours de la même manière (ligne de base ou tangentielle)
 - ▶ Variation considérée comme significative au-delà de 25% et 5g/l
 - ▶ Aspect possible de double pic en cas de polymérisation (IgA et M): sommer les pics
- ▶ Place de l'immunofixation dans le suivi?
 - ▶ Inutile pour le suivi standard
 - ▶ Utile si modification de la migration (confirmer qu'on a toujours la même Ig monoclonale)
 - ▶ Affirmer la disparition du pic par immunofixation
 - ▶ L'immunosoustraction n'est pas assez sensible pour affirmer une disparition de pic ou détecter un petit pic parmi une augmentation polyclonale

Les pièges de l'EPP

- ▶ Interférences
 - ▶ Fibrine: tube sec+++, attention aux anticoagulants à forte dose. Pic étroit à la jonction bêta2/gamma
 - ▶ Hémolyse: pic en bêta1
 - ▶ CRP: A forte concentration (au moins 300 mg/l) peut être visible au début des gammaglobulines.
 - ▶ Produits de contraste: aspect de pic en bêta
 - ▶ Usure des capillaires: petit pic entre l'albumine et la fraction alpha1
- ▶ Aspects atypiques:
 - ▶ Polymorphisme de l'alpha1 antitrypsine: aspect dédoublé de la fraction alpha1
 - ▶ Polymorphisme de l'haptoglobine: aspect dédoublé de la fraction alpha2



Les autres électrophorèses

En capillaire

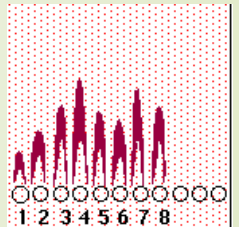
- En capillaire
 - Électrophorèse des protéines urinaires:
 - Typage de la protéinurie: tubulaire ou glomérulaire
 - Recherche et quantification des pics
 - Possible en l'absence de concentration des urines, préférer une technique de dialyse
 - Fréquences des pics multiples (chaînes légères, Ig totales)
 - A faire même en l'absence de protéinurie car les chaînes légères ne sont pas toujours bien dosées
 - Dosage de l'HbA1c, permet comme l'HPLC de visualiser d'éventuels variants
 - Électrophorèse de l'hémoglobine pour typage des variants (obligation d'avoir 2 techniques différentes)
 - CDT , séparation des différentes isoformes de la transferrine en fonction de leur degré de sialylation. La présence de di, mono et asialotransferrine est en faveur d'une intoxication alcoolique chronique.

Les techniques en gel standard

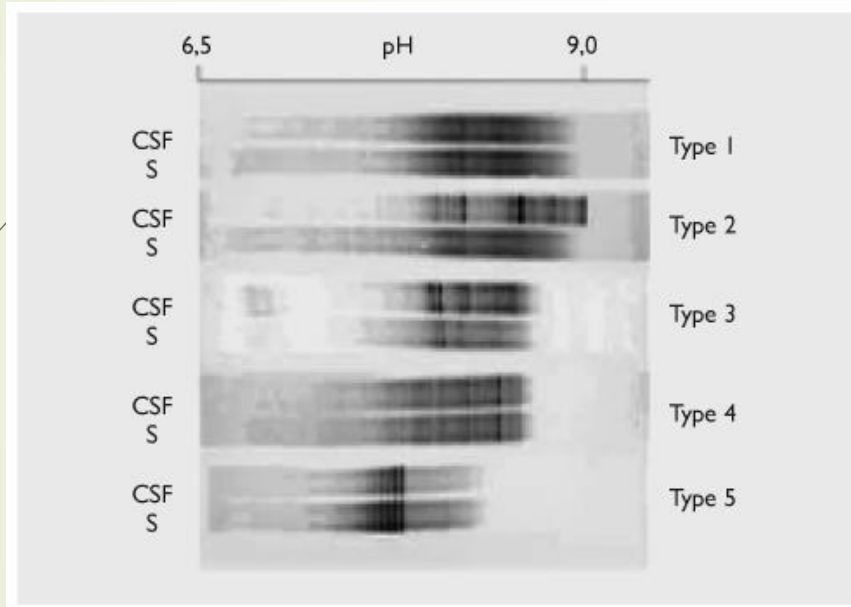
- ▶ Electrophorèse des urines mais quantification plus difficile (nécessite une concentration)
- ▶ Electrophorèse du LCR (pic plus important de préalbumine)
- ▶ Choix du colorant en fonction des protéines d'intérêt
 - ▶ Electrophorèse des lipoprotéines
 - ▶ Coloration au noir Soudan, spécifique des graisses
 - ▶ Electrophorèse concernant les enzymes (acétyls, isoenzymes)
 - ▶ Révélation mettant en jeu à la réaction enzymatique

L'utilisation des Ac en électrophorèse

- ▶ En capillaire: immuno-soustraction
 - ▶ Blocage d'un type de chaîne lourde ou légère par un Ac, réalisation de la migration et on recherche une disparition du pic.
- ▶ Immunofixation: après électrophorèse, dépôt de l'antisérum qui va précipiter la protéine d'intérêt. Lavage et élimination des protéines non précipitées
- ▶ Immunodiffusion: Ac présent dans le gel, migration de la protéine qui forme une flèche dont la hauteur est proportionnelle à la concentration
- ▶ Western blot: après transfert des protéines par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose, révélation de la protéine d'intérêt par un Ac spécifique.



L'isofocalisation



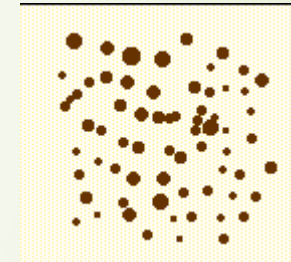
- pHi: pH pour lequel une particule chargée ne migre plus dans un champ électrique
- Gel avec gradient de pH: insertion dans le gel de molécules de synthèse (ampholytes) avec un pHi donné qui vont générer ce gradient, selon la gamme d'ampholytes utilisée on aura une répartition du pH plus ou moins étroite.
- Les protéines vont s'immobiliser au niveau de leur pHi
- Révélation par un anti sérum (anti IgG pour la recherche de bandes oligoclonales dans le LCR)

Séparation en fonction de la taille

- ▶ Technique utilisées préférentiellement pour la biologie moléculaire
- ▶ Les acides nucléiques sont chargés négativement de manière assez similaire, séparation en général sur gel d'agarose avec révélation au bromure d'éthidium.
- ▶ Pour les protéines: nécessité d'un traitement pour charger les protéines de manière similaire (SDS-PAGE)
 - ▶ Possibilité d'utilisé un gradient de concentration dans le gel pour optimiser la séparation
 - ▶ Utilisation d'un « stacking gel » qui permet de concentrer les protéines et de démarrer la migration de manière homogène, peut aussi bloquer les plus grosses protéines.

Autres électrophorèses

- ▶ BN-PAGE(blue native Page): permet de séparer des complexes de protéines issus de broyat cellulaire (ex: complexes de la chaîne respiratoire)
- ▶ Electrophorèse bidimensionnelle; couple une isofocalisation à une migration en fonction de la taille (SDS-PAGE)
- ▶ Electrophorèse en champ pulsé: permet de séparer de très grosses molécules d'ADN. Alternance de 2 champs électriques orthogonaux, la vitesse à laquelle les molécules sont capables de s'orienter dans le sens du courant est fonction de leur taille.



Conclusion

- L'électrophorèse demeure une technique clé de l'étude des protéines
- Utilisation en pratique quotidienne, analyse peu coûteuse permettant d'avoir une vision d'ensemble des protéines, mais aussi analyses plus spécialisées comme l'isofocalisation.
- Etape préalable indispensable à d'autres tests (Western-blot, séquençage...)
- Mais aussi technique de recherche (BN-PAGE, électrophorèse bidimensionnelle ou champ pulsé)

Bibliographie

- Méthodes physiques de séparation et d'analyses et méthodes de dosage des biomolécules.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E2.html>
- Le Carrer. Electrophorèse et immunofixation des protéines sériques. *Interprétations illustrées*. Sébia. 1994.
- Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines sériques. *Szymanowicz et al Ann Biol Clin* 2006