

## COMMUNICATIONS

---

### **Électrophorèse des protéines sériques chez le chien. Remarques sur les variations analytiques, proposition d'un modèle**

par Thérèse FOULON\*, Paule GROSLAMBERT\*, Paul GROULADE\*\*

---

#### RÉSUMÉ

Pour que l'électrophorèse des protéines sériques chez le chien soit utile au Praticien, il est nécessaire que le résultat soit expressif et reproductible. Ce n'est pas le cas actuellement, comme le montrent une étude interlaboratoire et celle des résultats proposés en référence pour le sujet normal dans diverses publications. 3 causes principales sont mises en évidence. Pour remédier à cet état d'incohérence, il est proposé un modèle du tracé à obtenir.

*Mots clés* : Électrophorèse, Protéines sériques, Chien, Modèle.

#### SUMMARY

#### SERUM PROTEINS ELECTROPHORESIS IN DOG. OBSERVATIONS UPON ANALYTICAL VARIATIONS, PROPOSAL FOR A MODEL

Serum proteins electrophoresis in dog has to be useful for practitioners. So, results have to be expressive and reproducible. That's not the case actually, as shown by an interlaboratory study and by results proposed as reference for normal subject in several publications. 3 principal etiologies are outlined.

To eliminate this incoherence, a model is proposed.

*Key words* : Electrophoresis, Serum proteins, Dog, Model.

---

\* Biochimie Médicale A, C.H.U. BP 217 X 38043 Grenoble Cedex 9

\*\* 11, rue Ernest Cresson 75014 Paris

L'électrophorèse est une méthode de séparation des particules ionisées sous l'influence d'un champ électrique. Les protéines sériques, molécules amphotères, représentent un important domaine d'application. Leur mobilité dépend principalement de leur charge, de leur taille, de la nature du support, de la solution tampon, de son pH, de sa force ionique, de la durée de migration. Il s'établit ainsi des zones de migration composées de fractions qui, après fixation et coloration, sont visualisées et estimées. Les caractéristiques numériques et morphologiques du tracé obtenu varient avec les espèces et pour chaque individu selon son état.

Pour que l'examen électrophorétique soit utile au praticien, il est impératif que les résultats soient expressifs et reproductibles. L'électrophorèse du même sérum, réalisée par différents laboratoires ne doit pas présenter de variantes significatives.

Actuellement, pour le chien, ce n'est pas le cas. Il existe une inquiétante diversité dans les résultats proposés. Nous comparons dans ce travail les résultats interlaboratoires<sup>o</sup> de l'électrophorèse des protéines sériques d'un chien. Après une analyse des dissemblances constatées, une étude de l'influence du type de colorant ainsi que du temps de migration, nous proposons un modèle de tracé où individualisation et morphologie des fractions sont significatives et dont les valeurs usuelles du sujet normal ont été établies (1).

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

- *Les sérums* utilisés ont été recueillis aseptiquement, sans hémolyse, en dehors d'une influence de corticoïdes, sur des sujets à jeun.

- *L'électrophorèse d'un même sérum* (sérum d'une chienne atteinte d'un pyomètre) a été exécutée dans *11 laboratoires* (3 hospitaliers, 8 civils) après dosage des protéines totales. La technique est l'électrophorèse de zone, sur support. Les différences portent essentiellement sur la nature et la provenance du support, le tampon, le volume de sérum déposé, les conditions électriques, la durée de migration et le type de colorant. L'ensemble des renseignements dont nous disposons, sont présentés dans le tableau I. Nous n'avons pas fait état des dimensions du support, car, malgré leur variabilité, il s'agit toujours de microméthodes, sauf pour le laboratoire numéro 5.

- 7 laboratoires utilisent l'acétate de cellulose, 2 selon la technique Hélène et 5 selon la technique Sebia. Le colorant est le rouge Ponceau (RP), sauf pour les laboratoires n° 2 et n° 5, qui utilisent l'amidoschwarz (AS).

---

<sup>o</sup> Nous exprimons notre vive gratitude aux laboratoires de Biologie médicale qui ont accepté de réaliser ces examens à titre de recherche, ainsi que notre confrère le Dr Marc Laumonier pour son aimable contribution.

labo	support	origine	colorant	tps mig	photomètre
1	Acétate	Hélène	RP	15 mn	Hélène Secam70
2	Acétate	Hélène	AS	30 mn	Hélène process 24
3	Acétate	Sebia	RP	25 mn	Cellomatic Sebia
4	Acétate	Sebia	RP	27 mn	Sebia
5	Acétate	Sebia	AS	240 mn	Cellosystem 2 Sebia
6	Acétate	Sebia (Olympus)	RP	35 mn	Cellosystem 2 Sebia
7	Acétate	Sebia	RP	30 mn	Cellomatic 2 Sebia
8	agarose	Hélène	AS	15 mn	Hélène process 24
9	agarose	Hélène	RP	13 mn	Hélène EDC
10	agarose	Hydrigel Sebia	AS	35 mn	Profil Sebia
11	agarose	Hydrigel Sebia	AS	30 mn	Profil Sebia

Tableau I : Principaux éléments techniques utilisés par chaque laboratoire.

- 4 laboratoires travaillent sur agarose, l'un révèle au RP, 3 à l'AS. Six fractions sont individualisées : Albumine + alpha 0, alpha 1, alpha 2, bêta 1 + bêta 2, bêta 3, gammaglobulines. L'expression est faite en valeur relative. Les séparations indiquées par chaque laboratoire ont été respectées, sauf pour le laboratoire n° 1. Pour ce dernier et pour le n° 6, la fraction alpha 0, bien individualisée, a été intégrée à l'albumine.

- *La reproductibilité et la comparaison des 2 colorants (RP et AS)* ont été effectuées selon une macrométhode sur *acétate de cellulose*, en utilisant un temps de migration identique :

- 4 à 6  $\mu$ l du même sérum (soit environ 300  $\mu$ g de protéines) sont déposés à l'extrémité cathodique de bandes d'acétate de cellulose gélifiées (cellogel Sebia 170 x 25 mm) dans un appareil à évaporation réduite (2) en solution tampon glyciné à pH 9,7. L'intensité est de 12 mA pour 11 bandes (10 bandes utiles plus 1/2 bande aux 2 extrémités), soit 0,44 mA/cm de large. La différence de potentiel est d'environ 220 Volts aux bornes du générateur. La durée de migration est de 4 heures. 2 bacs de migration ont été utilisés, soit 20 dépôts différents. Dans chaque bac, les protéines sont colorées :

- pour moitié à l'amidoschwarz 10B Merck, le fond décoloré au méthanol-acétique, puis transparisé ;

- pour moitié au rouge Ponceau S, décoloration acétique, transparisation.

La densitométrie est faite sur Cellosystem2 Sebia, exprimée par une courbe de même longueur que la migration, avec mention des valeurs relatives et absolues.

- *Comparaison de 2 méthodes : temps de migration et coloration différents ; étude de la répétabilité*

- Macrométhode décrite ci-dessus, coloration AS (méthode de référence)

- Semi-microméthode Sebia sur acétate de cellulose gélifié, durée de migration 30 minutes, coloration RP.

- *Étude statistique :*

- Les moyennes et écarts-types ont été déterminés pour la valeur relative de chaque fraction, pour l'ensemble des 11 laboratoires et pour chaque groupe de technique. La comparaison des moyennes obtenues selon chaque technique a été effectuée par un test non paramétrique de Mann et Whitney.

- Les résultats des essais de reproductibilité et répétabilité sont exprimés par la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (CV) ; la comparaison des techniques et des colorants est effectuée par le test t de Student.

## RÉSULTATS

### 1) Résultats obtenus par 11 laboratoires différents sur le même sérum :

- La valeur des *protéines* totales est de  $69 \pm 1,79$  g/l. Le coefficient de variation est de 2,6%, ce qui montre une grande homogénéité des résultats.

- En *électrophorèse*, il existe une disparité dans la morphologie des tracés et les valeurs des fractions.

- *Morphologie* : la hauteur et la longueur des courbes sont variables : le plus souvent, lorsque le tracé est court, les pics sont plus nets, plus étroits et paraissent plus hauts par rapport à l'albumine (fig. 1 et 2, laboratoires 7 et 9). La résolution est variable (fig. 1) ; exemple : bonne pour la courbe n° 5, mauvaise pour les courbes n° 4 et 3. La séparation entre les alpha et bêta est toujours nette, l'individualisation des zones bêta-gamma est souvent mauvaise. Sur acétate de cellulose (fig. 1), l'alpha 0 est très bien isolée sur les courbes n° 1 et n° 6, évoquée sur la courbe n° 5, ignorée par les 4 autres. C'est la raison pour laquelle nous avons trouvé logique de la compter avec l'albumine. Sur agarose (fig. 2), l'alpha 0 n'est jamais individualisée.

- *En ce qui concerne les valeurs* (tableau II), la plus grande dispersion se situe au niveau de la fraction alpha 2 (fig. 3), majorée sur agarose, surtout sur Hydragel Sebia, et ce aux dépens de l'albumine et des alpha 1 globulines. La fraction gamma est basse dans 2 cas, l'un sur acétate, l'autre

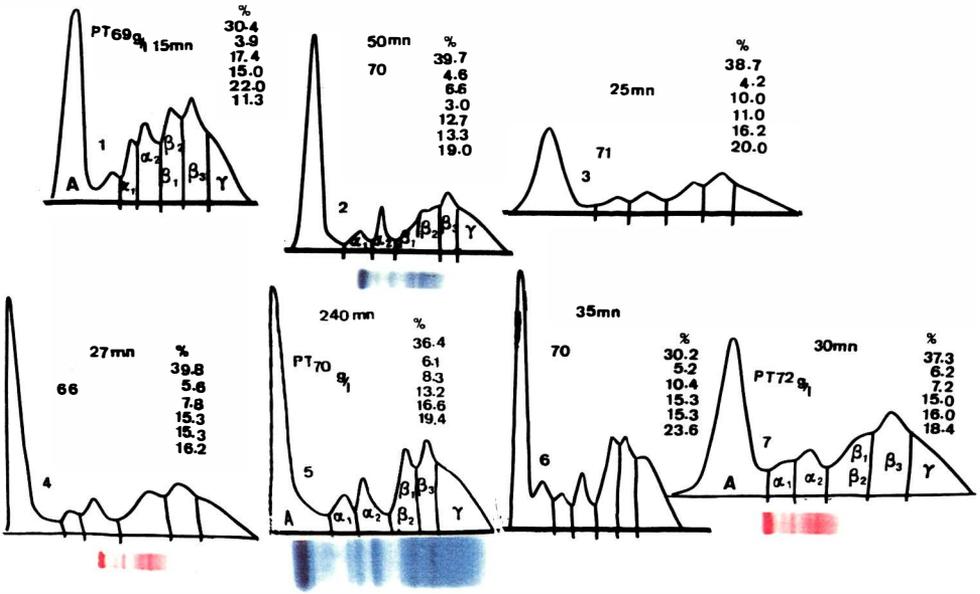


Figure 1 :

Électrophorèse des protéines sur acétate de cellulose :  
même sérum d'une chienne atteinte de pyomètre.

7 laboratoires : acétate Helena : 1 et 2 ; acétate Sebia : 3, 4, 5, 6, 7.

Alpha0 est révélée par 1 et 6, évoquée par 4 et 5, ignorée par les autres.

Alpha2 se présente en pic, témoin de l'état inflammatoire existant pour 1, 2, 5, 6.

Sa valeur est doublée pour 1. La meilleure individualisation est donnée par 5.

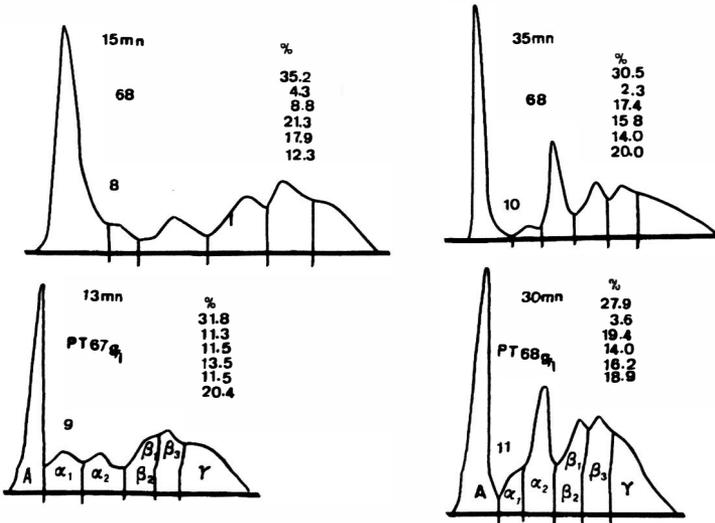


Figure 2 :

Électrophorèse des protéines sur agarose :  
même chienne, même sérum.

Agarose Helena : 8 et 9 ; agarose Sebia (Hydragel) : 10 et 11.

Alpha2 est pratiquement doublée de valeur sur le second par rapport au premier.

SUPPORT	n	Albumine	Alpha1	Alpha2	Bêta1-2	Bêta3	Gamma
Acétate	7	36,63 +/- 3,44	5,41 +/- 0,78	8,8 +/- 1,82	14,5 +/- 1,85	16,47 +/- 2,59	18,27 +/- 3,79
Agarose Helena	2	33,5 +/- 2,40	7,8 +/- 4,95	10,15 +/- 1,91	17,4 +/- 5,52	14,7 +/- 4,53	16,35 +/- 5,73
Agarose Sebia	2	29,2 +/- 1,84	2,95 +/- 0,92	18,4 +/- 1,41 **	14,9 +/- 1,27	15,1 +/- 1,56	19,45 +/- 0,78
Agarose tous	4	31,35 +/- 3,04	5,38 +/- 4,04	14,28 +/- 4,96 *	16,15 +/- 3,57	14,9 +/- 2,77	17,9 +/- 3,79
tous supports	11	34,71 +/- 4,12	5,4 +/- 2,29	10,79 +/- 4,12	15,1 +/- 2,57	15,9 +/- 2,64	18,14 +/- 3,60

Tableau II : Résultats des 11 laboratoires : expression en valeurs relatives, moyenne et écart-type. Comparaison des différentes techniques par le test de Mann et Whitney.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p = 0,0005$  : comparaison agarose/acétate de cellulose

°  $p = 0,0005$  : comparaison agarose Sebia/agarose Helena

Avec l'agarose Sebia, la fraction alpha2 est majorée de façon significative.

sur agarose ; ceci s'explique par la difficulté de séparation entre bêta 3 et gamma ; dans ces 2 cas, la fraction bêta 3 est plus élevée.

## 2) Reproductibilité et comparaison de 2 colorants (tableau III)

- La reproductibilité est moins bonne avec le colorant RP, comparé à l'AS (CV supérieurs).

- L'albumine est significativement majorée, les globulines alpha 1, alpha 2, bêta 1 + 2, bêta 3 sont significativement plus basses avec le RP. Il n'existe pas de différence significative au niveau des gammaglobulines.

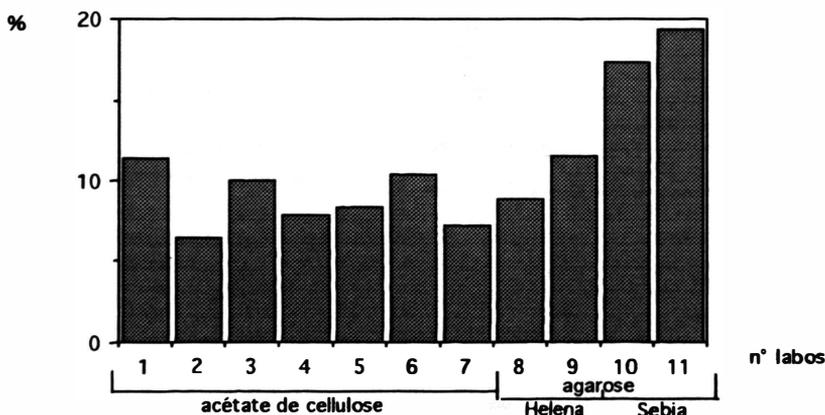


Figure 3 :  
Histogramme des valeurs d'alpha2 des 11 laboratoires,  
où apparaît très nettement l'importance des valeurs sur agarose Sebia.

	Amidoschwarz		Rouge Ponceau		t Student	p
	moyenne +/- écart-type	C.V.%	moyenne +/- écart-type	C.V.%		
Albumine	40,59 +/- 0,84	2,07	44,87 +/- 1,25	2,78	9	< 10-3
alpha 1	6,87 +/- 0,27	3,9	5,97 +/- 0,45	7,45	5,49	< 10-3
alpha 2	7,2 +/- 0,15	2,07	6,69 +/- 0,29	4,31	4,97	< 10-3
bêta 1+2	13,45 +/- 0,36	2,65	12,37 +/- 0,45	3,64	5,95	< 10-3
bêta 3	19,29 +/- 0,72	3,73	17,92 +/- 0,64	3,59	4,49	< 10-3
gamma	12,73 +/- 0,66	5,17	12,19 +/- 0,87	7,16	1,56	NS

Tableau III: Electrophorèse : reproductibilité et comparaison de 2 colorants (Amidoschwarz - AS - et Rouge Ponceau - RP -)

N = 10 ; *support* : acétate de cellulose ; *temps de migration* = 4 heures

Le coefficient de variation (CV) est meilleur pour toutes les fractions avec l'AS.

Avec le RP, l'albumine est significativement plus élevée, les globulines  $\alpha$  1,  $\alpha$  2,  $\beta$  1 + 2,  $\beta$  3 significativement plus basses.

	4 h Amidoschwarz		30 mn Rouge Ponceau		t Student	p
	moyenne +/- écart-type	C.V.%	moyenne +/- écart-type	C.V.%		
Albumine	53,36 +/- 0,997	1,87	57,94 +/- 2,49	4,3	5,393	<10-3
alpha 1	6,24 +/- 0,23	3,72	4,73 +/- 0,27	5,73	-13,887	< 10-3
alpha 2	6,23 +/- 0,236	3,79	5,44 +/- 0,275	5,06	- 6,939	< 10-3
bêta 1+2	6,55 +/- 0,207	3,16	8,105 +/- 0,605	7,46	7,693	< 10-3
bêta 3	13,54 +/- 0,398	2,94	10,81 +/- 0,828	7,66	- 9,399	< 10-3
gamma	13,54 +/- 0,398	1,17	12,96 +/- 1,068	8,24	- 1,609	NS

Tableau IV : Electrophorèse : comparaison de 2 méthodes sur acétate de cellulose avec temps de migration et colorant différents. Comparaison des moyennes par le test t de Student.

N = 10 ; *temps de migration, coloration* :

1) 4 heures, coloration Amidoschwarz (AS) : le coefficient de variation est meilleur pour toutes les fractions.

2) 30 mn, coloration Rouge Ponceau (RP) : l'albumine est significativement plus élevée, les globulines  $\alpha$  1,  $\alpha$  2,  $\beta$  1+2,  $\beta$  3 sont significativement plus basses.

### 3) Comparaison de 2 méthodes (tableau IV)

- La répétabilité est meilleure avec la macrométhode, colorant AS.
- Comme précédemment, l'albumine est significativement plus élevée, les 4 premières globulines significativement plus basses avec le RP.

## DISCUSSION

L'homogénéité des résultats concernant les protéines totales est satisfaisante.

Pour l'électrophorèse, l'expression en valeurs relatives nous paraît plus représentative que celle en valeurs absolues. Ces dernières introduisent par les protéines totales des variations supplémentaires sans rapport direct avec la migration des molécules, d'où une dispersion plus grande des valeurs.

La diversité d'expression des résultats interlaboratoires (morphologie et valeurs) que nous constatons se retrouve dans la littérature, comme l'indiquent les courbes 1 à 6 que nous présentons (fig. 4). Il s'agit de courbes proposées comme référence du sujet normal au cours de publications : 3 articles américains (3, 4, 5), 3 thèses vétérinaires françaises (6, 7, 8).

La disparité s'exprime dans le nombre des fractions, leur valeur et leur morphologie. Pour cette dernière, son intérêt majeur est ruiné par le flou des ondulations (courbes 1, 4), l'exagération des pics commune à toutes

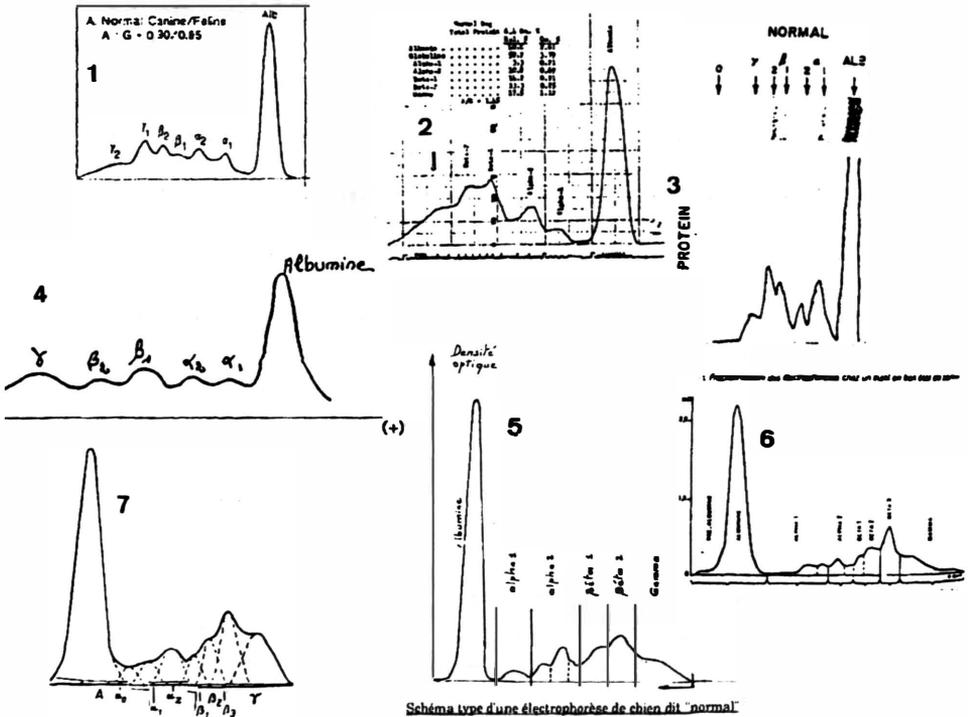


Figure 4 :

6 courbes prises dans la littérature, proposées comme référence du chien normal.

Les divergences sont évidentes : la courbe 1 donne un fractionnement semblable à la courbe 6 en désignant gamma ce que nous appelons bêta3.

Nous pensons que la mention "canine/féline" est un regrettable lapsus.

La courbe 7 est le fractionnement proposé par Boguth sur papier. Il n'est peut-être pas évident sur la figure, mais traduit une remarquable observation que l'acétate révèle exacte (courbe 6).

les fractions (courbe 3). Par un lapsus regrettable (courbe 1), les tracés du chien et du chat sont donnés comme identiques (chaque espèce a un tracé singulier).

Il nous paraît nécessaire de rappeler par la courbe 7, qu'en 1953 BOGUTH, cité par WUNDERLY (8) établit sur papier un fractionnement retrouvé avec plus de netteté sur acétate de cellulose (courbe 6).

En dehors de la discipline appliquée par chaque laboratoire dans le respect des conditions expérimentales indiquées par le fabricant, nous avons constaté l'existence de 3 causes principales de variations : *le support*, selon sa nature et sa provenance est la plus importante ; *les conditions de migration* (tampon, temps, température) peuvent être à l'origine de pics et de blocs factices par juxtaposition et superposition ; *la coloration* : le RP majore l'albumine (certains fabricants préconisent un facteur de correction, qui pour nous est une cause de divergences supplémentaires), et ses reproductibilité et répétabilité sont moins bonnes comparées à l'AS.

La variation des divers paramètres et leur interaction conduisent à des erreurs d'interprétation, dont nous donnons 3 exemples : un syndrome néphrotique (fig. 5), un syndrome inflammatoire et un cas d'immunoglobuline monoclonale (fig. 6).

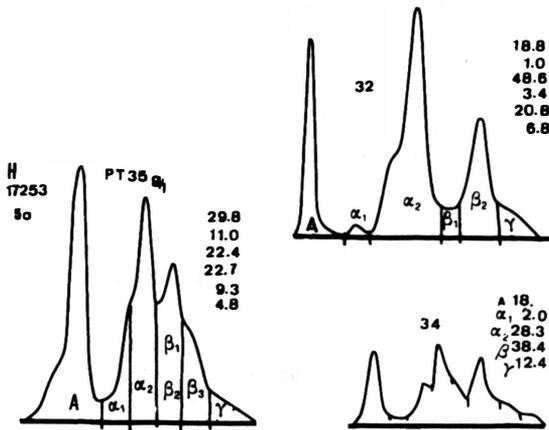


Figure 5 :

*Électrophorèse des protéines sur acétate.*

Le même sérum d'un chien atteint de syndrome néphrotique, par 3 laboratoires, dont nous avons respecté les indications :

*A gauche,* en bas : courbe typique du syndrome néphrotique.

*A droite,* en haut : la courbe évoque une inflammation du fait de l'élévation des alpha<sub>2</sub>, mais en rien un syndrome néphrotique par la zone bêta.

en bas : la courbe, semblable à celle de gauche, évoque un syndrome néphrotique, mais il nous a paru impossible de relier les valeurs aux séparations notées sur la courbe, 5 valeurs pour 8 séparations.

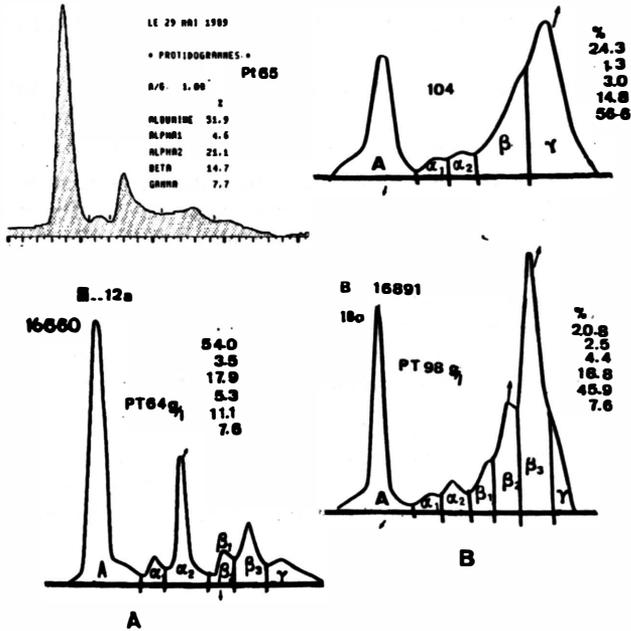


Figure 6 :

*A gauche* : A, syndrome inflammatoire. Même sérum, 2 laboratoires.

en haut : un pic d'alpha2 à base large évoque un état subaigu.

en bas : un pic d'alpha2 à base étroite évoque un état aigu, ce qui est confirmé par la clinique.

La zone bêta est mieux individualisée en bas qu'en haut.

*A droite* : B, hyperglobulinémie. Même sérum, 2 laboratoires.

en haut : évoque une polyclonale.

en bas, évoque une monoclonale, ce qu'une immunoelectrophorèse confirme.

Dans les 2 cas, les électrophorèses du haut conduisent à une erreur d'interprétation.

Nous pensons nécessaire que la présentation du résultat comporte la référence des valeurs normales propres à l'espèce considérée. Mais nous jugeons inacceptable que, pour un résultat concernant un animal, figurent celles de l'homme, comme il est de règle actuellement.

#### Proposition d'un modèle :

Le but essentiel de l'électrophorèse des protéines sériques doit être d'obtenir un tracé qui traduise de façon expressive et reproductible l'individualisation et la morphologie d'un maximum de fractions.

En nous basant sur notre expérience personnelle (première publication 1953 (9)... plus de 17 800 électrophorèses réalisées à ce jour),

nous pensons qu'actuellement, le support permettant le meilleur fractionnement est l'acétate de cellulose gélifié (170 x 25 mm), migration 4 heures, coloration AS, dont nous présentons un tracé (fig. 7). Sur ce support, la technique peut être adaptée à un temps plus court, minimum 30 minutes.

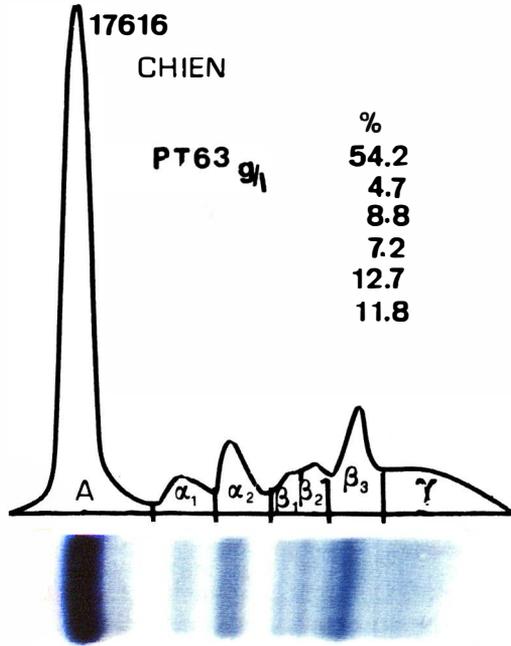


Figure 7:

*Electrophorèse des protéines sériques sur acétate de cellulose. Chien adulte normal.*

7 fractions visibles: albumine (comprenant  $\alpha_0$ ),  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$  (souvent comptées ensemble),  $\beta_3$ , gamma.

#### En conclusion :

Nous constatons une disparité dans la présentation des résultats d'électrophorèse des protéines sériques chez le chien, qui est une source de confusion et de contradiction. Cet état d'incohérence est gravement préjudiciable à la crédibilité de la méthode. Pour y remédier, il faut admettre que, chez le chien, il existe 7 fractions à mettre en évidence. Pour y réussir, il faut s'inspirer des résultats acquis par une méthode éprouvée dont on connaît la technique et les valeurs usuelles proposées. D'autre part, il faut se souvenir que si l'électrophorèse des protéines sériques est un examen simple, il exige un personnel attentif et entraîné pour un respect rigoureux des règles techniques.

**BIBLIOGRAPHIE**

- [1] GRELLIER (J.P.). - Les protéines sériques du chien normal et après intervention chirurgicale. Thèse Vétérinaire (Toulouse) 1972.
  - [2] GROULADE (J.) in MILANO (J.M.). - Electrophorèse sur acétate de cellulose des protéines sériques de l'homme adulte. Thèse Médecine (Grenoble) 1974, n° 20.
  - [3] KANEXO (Jim J.) . Serum proteins and the dysproteinemias, in, "Clinical biochemistry of domestic animals" 4th éd. Academic Press 1989, p. 151.
  - [4] JAIN (N.C.). - Schalm's Veterinary Hematology. 4th éd. Lea Febriger, Philadelphia, 1986, p. 959.
  - [5] BURGHEM (Georges A.), BEISSEL (William R.), WALTER (Jarry S.), NIMS (Robert M.), NAYSSELL (David L.), ALTDERANDT (Paul K.). - Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenie. Am. J.V.R. 1971, 32, 744-56.
  - [6] VALENSKI (D.E.). - Contribution à l'étude de la cellulite généralisée idiopathique du chien. Exploration immunitaire réalisée sur 9 cas. Thèse Vétérinaire (Alfort) 1991.
  - [7] BERAUD (A.). - Intérêt clinique de l'électrophorèse sur polyacétate de cellulose des protéines sériques du chien et du chat en médecine vétérinaire. Thèse Vétérinaire (Lyon) 1987.
  - [8] WUNDERLY (Ch.). - Electrophorèse sur papier. Vigot Frères. Paris 1936. p. 73.
  - [9] GROULADE (P.) et GROULADE (J.). - Étude par micro-électrophorèse sur papier du sérum de chiens normaux et pathologiques. Annales de l'Institut Pasteur, 1953, 1704, 508-512.
-